UNTERSUCHUNGEN ÜBER PROTEINKINASEN IN DER NEBENNIERENRINDE VOM RIND

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
MANFRED HIEP
aus Gech

Bochum 1983

UNTERSUCHUNGEN ÜBER PROTEINKINASEN IN DER NEBENNIERENRINDE VOM RIND

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
MANFRED HIEP
aus Goch

Bochum 1983

Für das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit bin ich zu besonderem Dank verpflichtet:

Herrn Prof. Dr. W.-H. Kunau für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine ständige Diskussionsbereitschaft,

Herrn Prof. Dr. K.P. Schäfer für die Übernahme des Koreferates,

Herrn Dr. G. Mayr für die Gabe von homogenem Calmodulin und myosin light chains,

Frau Dipl.-Biologin C. Balkow für die Überlassung von 100 Ü aus der Nebennierenrinde der Ratte und aus Y1-Zellen,

Frau Dr. M. Varsanyi für die Gabe von Casein-Sepharose 4B und Histon-Sepharose 4B,

Herrn Dr. U. Walter, Universität Würzburg, für die Gabe von 8-N_3-[^{32}P]cAMP und wertvollen Ratschläge,

allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie, Lehrstühle I und II, vor allem den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Bioorganische Chemie für freundliche Unterstützung und hilfreiche Diskussionen.

ABKÜRZUNGEN

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
Ci	Curie
DTE	1,4-Dithioerythrit
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGTA	Äthylenglykol-bis(2-Aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure
HSIP	Hitzestabiles Inhibitorprotein
IBMX	1-isobutylmethylxanthin
ipm	gezählte radioaktive Impulse pro Minute
ME	ß-Mercaptoäthanol
MES	2(N-Morpholino)-Äthansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
MOPS	2(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
O.D.	Optische Dichte
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POPOP	1,4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
SDS	Natriumdodecylsulfat
STI-Sepharose 4B	Sojabohnen Trypsin Inhibitor an Sepharose 4B gekoppelt
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TLCK	7-Amino-1-chlor-3-(p-tolylamido)-2-heptanon Hydrochlorid
TPCK	L-1-Chlor-3-phenyl-3-(p-toluol-Sulfonamido)-2-butanon
TFP	Trifluoperazin-Dihydrochlorid
U.p.M.	Umdrehungen pro Minute
100 Ü	100 000xg Überstand der Nebennierenrinde des Rindes

UNIV. LEIDEN BIB.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	6
2.1	Chemikalien und Radiochemikalien	6
2.2	Präparative Methoden	7
2.2.1	Herstellung von 100 000xg Überstand aus Nebennierenrinde	7
2.2.2	Kopplung von Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen an Sepharose 4B	8
2.2.3	Herstellung von ATP-γ-^{32}P	8
2.2.4	Präparation von partiell dephosphoryliertem Casein	9
2.2.5	Säulenchromatographie	9
2.2.5.1	Gelchromatographie an Sephacryl S-300	10
2.2.5.2	Gelchromatographie an Sepharose CL-6B	10
2.2.5.3	Kationenaustauschchromatographie an Phosphocellulose P-11	10
2.2.5.4	Anionenaustauschchromatographie an DE-52	11
2.2.5.5	Affinitätschromatographie an Histon-Sepharose 4B	11
2.2.5.6	Chromatofocussierung	11
2.2.6	pH 5.5 Fällung von 100 000xg Überstand	12
2.2.7	Reinigung der Enzyme	12
2.2.7.1	Reinigung der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase	12
2.2.7.2.1	Affinitätschromatographie der cGMP-abhängigen Proteinkinase an cAMP-Agarose	13
2.2.7.2.2	Entfernung des cGMP durch Mikrozentrifugenentsalzung	14
2.2.7.3	Reinigung der Caseinkinase A	14
2.2.7.3.1	Hydroxylapatitchromatographie an HA-Ultrogel	14
2.2.7.3.2	Chromatographie an 5'-AMP-Sepharose 4B	15
2.2.7.3.3	Affinitätschromatographie an Casein-Sepharose 4B	15

		Seite
2.3	Analytische Methoden	16
2.3.1	Leitfähigkeitsmessungen	16
2.3.2	pH-Messungen	16
2.3.3	Proteinbestimmungsmethoden	16
2.3.3.1	Proteinbestimmung im Technicon-Autoanalyzer	16
2.3.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	17
2.3.4	Bestimmung der Proteinkinaseaktivität	17
2.3.4.1	cAMP-abhängige Proteinkinase	17
2.3.4.2	cGMP-abhängige Proteinkinase	17
2.3.4.3	cAMP-unabhängige Proteinkinase	18
2.3.4.4	Caseinkinase	18
2.3.5	Photoaffinitätsmarkierung von Proteinfraktionen mit 8-N_3-[^{32}P]cAMP	19
2.3.6	Elektrophoretische Methoden	19
2.3.6.1	Slabgel-Polyacrylamid-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) nach Laemmli	19
2.3.6.2	Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter nativen Bedingungen	22
2.3.7	Bestimmung der Proteinkinaseaktivität in nativen Röhrchengelen	24
2.3.8	Bestimmung der [^{32}P]-Radioaktivität in Gelscheibchen	24
2.3.9	Trocknen von Plattengelen	24
2.3.10	Autoradiographie von Plattengelen	25
2.3.11	Entwicklung der Röntgenfilme	25
3.	Ergebnisse - Teil A	26
3.1	Gelfiltration an Sephacryl S-300 in Gegenwart von 10 µM cAMP	26
3.1.1	Chromatographie von 100 Ü an Sephacryl S-300	26
3.1.2	Chromatographie von 100 Ü an 5'-AMP-Sepharose 4B	27
3.1.3	Chromatographie des 1 M KCl Peaks der 5'-AMP-Sepharose 4B Säule an Sephacryl S-300	28

Seite

3.2	Chromatographie von 100 Ü an Phosphocellulose P-11	30
3.2.1	Vergleich des Elutionsprofils der Proteinkinasen durch Salzstufenelution und kombinierte Stufen- und Gradientenelution	30
3.2.2	Untersuchung der drei Histonkinase-Aktivitäten des 0.2 - 0.4 M NaCl Bereichs der Phosphocellulose P-11 Säule	33
3.2.2.1	Native Gelelektrophorese nach Davies	33
3.2.2.2	Photoaffinitätsmarkierung mit 8-N_3-[^{32}]cAMP. Vergleich mit 100 Ü vom Rind, Ratte und Y1-Zellen	34
3.2.3	Einfluß von Triton X-100 und Proteaseinhibitoren auf das Proteinkinase-Profil der P-11 Säule	37
3.2.4	Der Effekt von Proteaseinhibitoren und NEM auf die Aktivität der Caseinkinase A	41
3.3	Endogene Phosphorylierung des Durchlaufs und des 1 M NaCl-Eluats einer Phosphocellulose P-11 Säule	41
3.4	Chromatographie eines Phosphocellulose P-11 Durchlaufs an DEAE-Cellulose (DE-52) in Gegenwart von 10 µM cAMP	45
3.5	DE-52 Chromatographie von 100 Ü nach pH 5.5 Fällung	48
4.	Ergebnisse - Teil B	50
4.1	Caseinkinase A	50
4.1.1	Chromatographie an Hydroxylapatit (HA-Ultrogel)	50
4.1.2	Chromatographie an 5'-AMP-Sepharose 4B	50
4.1.3	Chromatographie an Casein-Sepharose 4B	53
4.1.4	SDS-Gelelektrophorese	53
4.2	Caseinkinase G	56
4.2.1	Reinigung des 1 M NaCl Peaks der P-11 Säule an Hydroxylapatit (HA-Ultrogel)	56

Seite

4.2.2	Effekt von Spermin und Spermidin auf die Phosphorylierung von Casein	59
4.2.3	Einfluß von Spermin und Spermidin auf die endogene Phosphorylierung der Caseinkinase G (HA-Ultrogel Fraktion)	60
4.3	cAMP-unabhängige Proteinkinase	62
4.3.1	Zeitkinetik der Phosphorylierung von Histon Typ IIa bei zwei verschiedenen pH-Werten und niedriger und hoher Mg^{2+}-Ionen Konzentration im Testansatz	62
4.3.2	Native Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration an Sepharose CL-6B	62
4.3.3	Chromatofocussierung an PBE 94	64
4.3.4	Einfluß von Calmodulin auf die Zeitkinetik der Phosphorylierung von Histon Typ IIa	66
4.3.5	Phosphorylierung von myosin light chains in Abwesenheit oder Gegenwart von Calmodulin	67
4.3.6	Bindungsversuch der cAMP-unabhängigen Proteinkinase an Calmodulin-Sepharose 4B	67
4.3.7	Parallelität der Histonkinase- und myosin light chain Kinase Profile an zwei verschiedenen Säulen	71
4.3.7.1	Chromatographie an DEAE-Cellulose (DE-52)	71
4.3.7.2	Chromatographie der DE-52 Enzymfraktion an Histon-Sepharose 4B	71
4.4	Katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase	74
4.4.1	Reinigung der katalytischen Untereinheit	74
4.4.2	SDS-Gelelektrophorese	74
4.5	cGMP-abhängige Proteinkinase	79
4.5.1	Reinigung der cGMP-abhängigen Proteinkinase durch Affinitätschromatographie an cAMP-Agarose	79
4.5.2	SDS-Gelelektrophorese	79

Seite

4.5.3	Effekt von Calmodulin auf die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase in Gegenwart verschiedener Histonsubstrate	81
4.6	Vergleich der Substratspezifitäten der drei isolierten Histonkinasen	83
4.7	Phosphorylierung einer partiell gereinigten Cholesterinester-Hydrolase aus der Nebennierenrinde durch die drei Histonkinasen	85
5.	Diskussion	89
6.	Zusammenfassung	98
7.	Literaturverzeichnis	100

1. Einleitung

Steroidogenese (Steroidhormon-Bildung)

Steroidhormone werden in der Nebennierenrinde, den Gonaden und der Placenta synthetisiert. Die Histologie der Nebennierenrinde von Säugetieren zeigt drei Hauptgruppen von Zelltypen, die durch ihre Organisation in situ charakterisiert sind [1]. Die Zona glomerulosa (Äußere Region: Ball-Muster), die Zona fasciculata (Zentrale Region: Säulen-Muster) und die Zona reticularis (Innere Region: Netzwerk-Muster) [1]. Alle drei Zonen bilden Steroidhormone, wobei das Mineralocorticoid Aldosteron nur von der Zona glomerulosa produziert wird, während die Zona fasciculata-reticularis für die Produktion der Glucocorticoide Cortison und Corticosteron verantwortlich ist [2,3]. Alle Gewebe, die Steroidhormone bilden, enthalten Mitochondrien, die in der Lage sind, Cholesterin in das Zwischenprodukt der Steroidhormon-Synthese, Pregnenolon,umzuwandeln [4]. Das für die Synthese benötigte Cholesterin stammt entweder aus der de Novo-Synthese [5] oder aus der Freisetzung von Cholesterin durch die Cholesterinester-Hydrolase aus intrazellulären Cholesterinester-Pools [6]. Die Reaktionssequenz der Steroidogenese verteilt sich auf die Kompartimente der Mitochondrien und der Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Reaktion der Cholesterin-Seitenkettenspaltung (side chain cleavage reaction) und findet in den inneren Cristae der Mitochondrien statt [7-9].

Heute gilt es als erwiesen, daß der Prozeß der Steroidogenese in der Nebennierenrinde sowohl durch das Adrenocorticotrophe Hormon (ACTH) [10-21] als auch durch Angiotensin II (Zona glomerulosa) reguliert wird. Das gereinigte ACTH-Molekül besteht aus einer Polypeptidkette von 39 Aminosäuren [22,23]. Für die Aktivierung der Nebennieren-Zellen

mit anschließender Produktion von Steroidhormonen wird nicht die komplette Polypeptidkette benötigt. Die Arbeit von Sayers und seinen Mitarbeitern [17,24,25] zeigte, daß die erfolgreiche Interaktion mit dem Plasmamembran-Rezeptor nur die ersten 24 Aminosäuren des ACTH-Moleküls erfordert und daß dies eine steroidogene Wirkung in den Zellen hervorruft. Ebenso wurde gezeigt, daß es für das Polypeptid nicht erforderlich ist, die Zellmembran zu durchdringen, weil ein an ein hochmolekulares synthetisches Polymer gekoppeltes ACTH-Molekül eine gleiche Wirkung auf die Zellen besitzt. Diese Studien deuteten auf die Existenz spezifischer Rezeptoren an der äußeren Oberfläche der Plasmamembran der Nebennierenzellen hin [26-30]. Die Hormon-Rezeptor Komplexbildung kann nachfolgend die Aktivierung einer membrangebundenen Adenylat-Cyclase oder Phospholipase, Änderungen der Zusammensetzung der Membran-Phospholipide oder der Verteilung der Ca^{2+}-Ionen innerhalb der Membran bewirken [31]. Die Art und Weise, in der der Hormon-Rezeptor Komplex das Adenylat-Cyclase- (oder Guanylat-Cyclase-System) beeinflußt, ist weitgehend unbekannt. Neuere Informationen ergaben, daß der Rezeptor und das Enzym voneinander getrennte, verschiedene Molekülkomplexe darstellen, die voneinander nach der Loslösung von der Membran durch geeignete chromatographische Techniken getrennt werden können [32].

Studien von Haynes und Berthet [13] zeigten, daß die Aktivierung adrenaler Gewebe durch ACTH mit einem gleichzeitigen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration verbunden ist. Der Anstieg der cAMP-Konzentration stand in Bezug zu einer Steigerung der Steroidogeneserate, da exogen zugesetztes cAMP die Steroidhormon-Synthese steigerte, ohne daß ACTH zugegen war. Diese Beobachtungen führten dazu, daß dem cAMP die Rolle eines "second messengers" zugeschrieben wurde, der eine Übermittlerrolle für das ACTH-Signal in der Zelle spielt. In neuerer Zeit wurden Zweifel

an dieser Hypothese geäußert, da sehr niedrige ACTH-Konzentrationen, die zu einer Stimulierung der Steroid-Sekretion ausreichen, keinen meßbaren Anstieg der cAMP-Konzentration hervorriefen [33]. Zum anderen ergaben Forschungen, die nach einem alternativen "second messenger" für ACTH gesucht haben, daß niedrige Konzentrationen an ACTH einen schnellen, aber der Sekretion vorauslaufenden Anstieg der Konzentration an cGMP und eine verstärkte Proteinphosphorylierung bewirkten. Ein Anstieg der cAMP-Konzentration erfolgte zeitlich später und erforderte höhere Konzentrationen des Hormons [34-36]. Auf der Basis dieser Beobachtungen haben Sharma und seine Mitarbeiter vorgeschlagen, daß eher cGMP als cAMP der wichtige intrazelluläre Mediator der ACTH-Wirkung ist. Andere Laboratorien haben versucht, die Wichtigkeit der cGMP-Regulation nachzuweisen, indem sie die adrenale Guanylat-Cyclase durch Substanzen stimulierten, die nicht auf die Adenylat-Cyclase wirkten. Nebennierenzellen, die mit Natriumnitroprussid oder Ascorbinsäure behandelt wurden, zeigten hohe Anstiege in der Konzentration an cGMP, aber weder einen Anstieg an cAMP noch der Steroid-Sekretion [21]. Daher scheint ein Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration allein kein hinreichender Stimulus für die Steroidogenese zu sein. Eine Erklärung für die fehlende Korrelation zwischen den cAMP-Gewebekonzentrationen und der ACTH-Wirkung könnte in einer Kompartimentierung des biologisch aktiven cAMP liegen [37]. Es könnte nur eine kleine Fraktion des totalen zellulären cAMP an der Regulation an bestimmten und begrenzten Orten in der Zelle beteiligt sein und ein Anstieg in dieser kritischen Fraktion würde nicht einen meßbaren Anstieg im totalen zellulären cAMP-Gehalt ergeben. Die Kompartimentierungs-Hypothese wird durch weitere Beobachtungen unterstützt, die zeigen, daß cAMP in der Tat ein kritischer Mediator ist. Zellkulturen von Zellen eines Tumors der Nebennierenrinde der Maus (Y1-Zellen), die nach ihrer Resistenz gegenüber Effekten von cAMP-Analogen wie 8-bromo-cAMP oder Dibutyryl-cAMP ausgesucht wurden, sind ebenso resistent gegenüber den

Effekten von ACTH auf die Zellmorphologie, Wachstum und Steroidogenese [38,39]. Außer den cyclischen Nukleotiden cAMP und cGMP werden in der Literatur auch Ca^{2+} [40] und Polyphosphatidylinositide [41,42] als "second messenger" diskutiert.

Proteinkinasen

Die Forschung der letzten 10 Jahre hat erbracht, daß ein genereller Kontrollmechanismus intrazellulärer Ereignisse, die durch nervöse oder hormonale Stimuli gesteuert werden, die reversible Proteinphosphorylierung von Enzymen und anderen Proteinen ist. Diese Reaktionen werden von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen katalysiert. Auch heute werden die durch Hormone stimulierten Wirkungsketten der Proteinkinasen und Proteinphosphatasen in vielen Gewebssystemen immer noch mit dem zuerst erforschten Gebiet der Regulation der Glykolyse verglichen [43,44,45]. Durch Gill und Garren wurde erstmals im Cytosol der Nebennierenrinde des Rindes eine Proteinkinase nachgewiesen [46], die durch cAMP aktivierbar war. Es ist jedoch wichtig zu bemerken, daß die cAMP-abhängige Proteinkinase nur eine Spezies aus einer großen Anzahl verschiedener Proteinkinase-Klassen darstellt. Viele Proteinkinasen können anhand ihres Regulationsmechanismus charakterisiert werden, so z.B. die durch cyclische Nukleotide regulierten Proteinkinasen (cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen), Ca^{2+}-Calmodulin-abhängige Proteinkinasen und die Ca^{2+}-Phospholipid-abhängige Proteinkinase. Die Aufklärung der Rolle der sogenannten cAMP-unabhängigen Proteinkinasen ist eine der größten Herausforderungen auf diesem Arbeitsgebiet, da die Moleküle, die die meisten Typen dieser Proteinkinase-Klasse regulieren, bisher noch nicht identifiziert wurden. 1977 wurde durch Cochet et al. [47] zum ersten Mal die Existenz einer cAMP-unabhängigen Proteinkinase in der Nebennierenrinde des Rindes nachgewiesen. Es stellte sich heraus, daß Casein

ein guter Phosphatakzeptor für diese Proteinkinase war, wohingegen das häufig verwendete Substrat Histon kaum phosphoryliert wurde. Es konnte dann gezeigt werden, daß der hochmolekulare Enzymkomplex (MG 300 000 D) aus zwei Enzymaktivitäten besteht, von denen eine sowohl ATP als auch GTP als Substrat benutzen kann [48]. Die beiden Enzyme wurden daher als Caseinkinase A und Caseinkinase G bezeichnet.

Problemstellung

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war es, die mit exogenen Substraten wie Histon und Casein nachweisbaren Proteinkinase-Aktivitäten zu identifizieren, voneinander zu trennen, weitestgehend aufzureinigen und näher zu charakterisieren. Ein weiteres Ziel war auch die Abtrennung der Proteinkinase-Aktivitäten von der Cholesterinester-Hydrolase (CEH), dem Schlüsselenzym in der Bereitstellung des für die Synthese der Steroidhormone benötigten Cholesterins, um die Voraussetzung für in vitro Phosphorylierungsversuche dieses Enzymes zu schaffen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Radiochemikalien

Sepharose 4B, Sepharose CL-6B, Sephacryl S-300, Sephadex G-50, 5'-AMP-Sepharose 4B, Polypuffer-Austauscher PBE^{TM}94 und Polypuffer 94 waren von Pharmacia, Uppsala (Schweden).

Phosphocellulose P-11, DEAE-Cellulose DE-52 und Glasfaserfilter GF-25 wurden bei Whatman, Maidstone, Kent (England) erworben.

Histon Typ IIa, Histon H1, Histon H2b, Protamin, Hitzestabiles Inhibitorprotein (Walsh-Inhibitor), Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen, cAMP, cGMP und Benzamidin wurden bei der Firma Sigma, München (BRD) gekauft.

Ein Protease-Inhibitor Satz der Leupeptin, Pepstatin A, Antipain, Chymostatin und ε-Amino-caproyl-p-chlorobenzylamid enthielt, wurde von der Firma Transformation Research Inc., Framingham (USA) gekauft.

cAMP-Agarose war von PL-Biochemicals, Milwaukee (USA) und Hydroxylapatit HA-Ultrogel wurde von der Firma LKB, Bromma (Schweden) bezogen.

Casein nach Hammarsten wurde von der Firma Merck, Darmstadt (BRD) geliefert.

Acrylamid, Bisacrylamid und Serva Brillant Blau (G-250, R-250) wurden bei Serva, Heidelberg (BRD) erworben.

Casein-Sepharose 4B und Histon-Sepharose 4B waren ein Geschenk von Frau Dr. M. Varsanyi, Ruhr-Universität Bochum.

Homogenes Calmodulin aus Rinderhirn, Calmodulin-Sepharose 4B und calmodulinfreie homogene myosin light chains wurden von Dr. G. Mayr, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt.

Trifluoperazin war ein Geschenk von Smith und Kline, (USA).

[^{32}P]-Phosphat (7-10 mCi) wurde von den Firmen Amersham-Buchler, Braunschweig und NEN, Dreieich (BRD) bezogen.

8-N_3-[^{32}P]cAMP (28.5 · 10^3 ipm/pmol) war ein Geschenk von Dr. Ulrich Walter, Universität Würzburg.

X-OMAT AR Röntgenfilme (12.8 cm x 17.7 cm), Röntgenentwickler LX-24 und Röntgenfixierer AL4 wurden bei der Firma Kodak gekauft.

Alle anderen verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität und stammten von den üblichen, in der BRD vertretenen Herstellerfirmen.

2.2 Präparative Methoden

2.2.1 Herstellung von 100 000xg Überstand aus Nebennierenrinde

Rindernebennieren wurden vom Schlachthof Bochum erworben und gleich nach der Entnahme bis zum Transport ins Labor auf Eis gekühlt. Die Nebennieren wurden dann der Länge nach aufgeschnitten und halbiert. Die Medulla wurde sorgfältig herausgekratzt und der so präparierte Cortex in kleine Stückchen geschnitten. Alle weiteren Präparationsschritte wurden bei 0-4°C durchgeführt. Zur Homogenisierung wurden zwei Puffer verwendet:

Homogenisationspuffer A:
20 mM Tris/HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 2 mM DTE, 0.25 M Saccharose.

Homogenisationspuffer B:
10 mM Tris/HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 2 mM DTE, Pepstatin A, Leupeptin, Chymostatin, Antipain (je 1 µg/ml), 50 µM ε-Amino-caproyl-p-chlorobenzylamid, 10 mM Benzamidin.

Der kleingeschnittene Cortex wurde im Verhältnis 1.5 Vol. Puffer zum Gewicht für 3 x 15 sec in einem Waring-Blendor (Stufe: "high") homogenisiert. Das Homogenat wurde danach unter Rühren mit einem Pistill durch große Plastiksiebe gegeben. Der Durchlauf wurde nochmals durch kleine Teesiebe gegeben und dann zum Aufschluß der Zellen in einem motorgetriebenen Elvehjem-Potter bei 600 U.p.M. 3 x homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat bei 20 000 g für 10 min in einer Sorvall RC 2-B (GSA-Rotor) zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand anschließend entweder in einer Beckmann-Zentrifuge (Rotor TI 45) oder in einer Hitachi-Zentrifuge (Rotor HI 45) bei 100 000xg zentrifugiert. Der 100 000xg Überstand wurde mittels einer Pasteurpipette aus den Zentrifugenröhrchen vom Boden aus entnommen und die Fettphase, die an der Oberfläche flotierte, sorgfältig abgetrennt. Der Überstand wurde dann in Portionen von 5 bis 200 ml bei -20°C eingefroren und bei dieser Temperatur bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

2.2.2 Kopplung von Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen an Sepharose 4B [49]

Zu 20 g CNBR-aktivierter Sepharose 4B wurden 10 mg Trypsin Inhibitor aus Sojabohnen in 100 ml eines 50 mM $NaHCO_3$-Puffers pH 8.5 gegeben. Die Reaktion wurde unter leichtem Rühren für 16 Stunden bei 4°C durchgeführt. Danach wurde das Sepharose-Derivat abgenutscht, mit 2 l Bikarbonat-Puffer gewaschen, mit 500 ml 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTE nachgewaschen und in diesem Puffer bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3 Herstellung von ATP-γ-^{32}P [50]

18.3 mg ATP-Dinatriumsalz (ca. 30 µMol) wurden in ein Reagenzglas eingewogen. Folgende Lösungen wurden hinzupipettiert:

0.5 ml 0.5 M Tris/HCl (pH 8.0); 2.5 ml H_2O bidest; 0.06 ml 1 M $MgCl_2$-Lösung; 0.5 ml 0.1 M NaOH; 0.2 ml Cysteinbase (12 mg/ml); 0.17 ml 3-Phosphoglycerat (16.2 mg/ml); 0.05 ml NAD (10 mg/ml); 3 ml ^{32}P-Phosphat (7-10 mCi in 1 ml 0.01 N HCl, 0.2 ml 10 mM K_2HPO_4/10 mM KH_2PO_4 und 1.8 ml H_2O bidest); 0.1 ml Glyzerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (10 mg/ml) und 0.01 ml 3-Phosphglycerat-Kinase (10 mg/ml).

Die Mischung wurde 120 min bei 30°C inkubiert. Danach wurden 900 mg Aktivkohle hinzugegeben und nach 15 min auf eine mit einem Cellulose-Bett beschichtete Säule aufgetragen. Es wurde 3 mal mit 10 ml H_2O bidest gewaschen und das gebundene Nukleotid mit 45 ml 50% Äthanol/1% NH_4OH eluiert, am Rotationsverdampfer fast bis zur Trockene eingeengt, und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4 Präparation von partiell dephosphoryliertem Casein [51]

Casein (1.2 g) wurde in 20 ml H_2O bidest suspendiert (60 mg/ml). Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf pH 9.5 eingestellt und der Ansatz gerührt, bis alles Casein gelöst war. Danach wurde für 10 min bei 95°C erhitzt, abgekühlt, und der pH-Wert mit 5 N HCl auf pH 7.0 eingestellt. Das gelöste Casein wurde mit H_2O bidest auf eine Konzentration von 15 mg/ml verdünnt und in 10 ml Portionen bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5 Säulenchromatographie

Alle Säulen wurden bei 4°C betrieben und der Durchfluß durch motorgetriebene Pumpen reguliert.

2.2.5.1 Gelchromatographie an Sephacryl S-300

Die benutzte Säule (Ø = 2.5 cm) wurde bis zu einer Höhe von 132 cm gefüllt. (V = 700 ml) Die Säule wurde danach bei einem Fluß von 60 ml/h mit 4 Vol. 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 10% Glyzerin, 0.1 M KCl, 5 mM Theophyllin, 1 mM DTE, 1 mM EDTA gespült. Danach wurde mit 2 Vol. desselben Puffers + 10 µM cAMP (Puffer A) bis zur vollständigen Äquilibrierung der Säule nachgewaschen.

2.2.5.2 Gelchromatographie an Sepharose CL-6B

Die Säule (1.6 cm x 80 cm) V = 160 ml wurde nach den Angaben des Herstellers gepackt und mit 4 Vol. 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM DTE, 0.2 mM Benzamidin (Puffer B) bei einer Flußrate von 20 ml/h äquilibriert.

2.2.5.3 Kationenaustauschchromatographie an Phosphocellulose P-11

Die Phosphocellulose wurde nach den Angaben des Herstellers vorbehandelt und entweder im Batch-Verfahren oder als Material für die Säulenchromatographie verwendet. Folgende Äquilibrierungspuffer wurden verwendet:

Puffer C: 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA
1 mM DTE, 0.1 M NaCl

Puffer D: 10 mM MOPS pH 6.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA,
1 mM DTE, 50 mM NaCl, 1 mM Benzamidin

Die gebundenen Proteinkinasen wurden entweder durch Salzstufen oder linearen Gradienten von der Säule eluiert.

2.2.5.4 Anionenaustauschchromatographie an DE-52

Das vorgequollene Gel wurde in einen 10-fach konzentrierten Puffer gegeben und der pH-Wert mit 1N HCl auf den gewünschten Wert eingestellt. Danach wurde solange gerührt und nachtitriert, bis der pH-Wert konstant blieb.
Zur Äquilibrierung und zur Chromatographie wurde folgender Puffer benutzt:

Puffer E: 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE.

Die Elution der gebundenen Proteinkinasen erfolgte durch lineare Salzgradienten.

2.2.5.5 Affinitätschromatographie an Histon-Sepharose 4B

Das bei 4°C mit 0.02% Azid gelagerte Gelmaterial wurde mit 5 Vol. Puffer E (siehe 2.2.5.4) äquilibriert und konnte dann zur Chromatographie verwendet werden. Die Elution der gebundenen Proteinkinase-Aktivitäten erfolgte durch einen linearen Salzgradienten.

2.2.5.6 Chromatofocussierung

Säulenpuffer:
- Startpuffer für Säule und Probe:
  25 mM Imidazol/HCl pH 7.4
- Elutionspuffer:
  Polypuffer 94/HCl pH 4.0

Beide Puffer wurden vor Gebrauch entgast.

Vorbereitung des PBE-Austauschers:
20 ml Gel wurden auf der Nutsche mit 10 Vol. Startpuffer gewaschen und nach dem Entgasen in eine Säule (30 cm x 0.9 cm, V = 20 ml) gefüllt. Die Säule wurde nach dem Gießen mit weiteren 5 Vol. Startpuffer gewaschen.

Chromatographie:
Nach dem Vorlauf von 10 ml Polypuffer 94 pH 4.0 wurde die Probe auf die Säule aufgetragen. Nach dem Einsinken der Probe erfolgte die Elution mit Polypuffer 94 pH 4.0 mit einer Flußrate von 20 ml/h ≙ 1 Säulenvolumen/h.

2.2.6 pH 5.5 Fällung von 100 000xg Überstand [52]

100 000xg Überstand (175 ml) wurde tropfenweise mit 1 N CH_3COOH auf pH 5.5 gebracht. Nachdem für 15 min gerührt worden war, wurde die angesäuerte Lösung für 15 min bei 20 000xg abzentrifugiert. Der Überstand (V = 153 ml) wurde verworfen und das Pellet in 60 ml Puffer E/1 mM Benzamidin aufgenommen und in einem Elvehjem-Potter bis zur vollständigen Lösung homogenisiert. Danach wurde der pH-Wert mit 1 M Tris-Base auf pH 7.5 eingestellt.

2.2.7 Reinigung der Enzyme

2.2.7.1 Reinigung der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase

Vorbehandelte Phosphocellulose P-11 wurde mit 10 mM MOPS pH 6.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE, 50 mM NaCl, 1 mM Benzamidin (Puffer D) äquilibriert. Ein 100 000xg Überstand (400 ml) präpariert in Homogenisationspuffer B wie in 2.2.1 beschrieben, wurde auf eine Konzentration an 10 mM MOPS, 50 mM NaCl gebracht und der pH-Wert auf 6.5 eingestellt. Die vorbereitete Phosphocellulose wurde in einem Verhältnis von 200 ml gepacktem Gel zu 400 ml Extrakt gegeben. Die Suspension wurde für 20 min gerührt, das Gel auf einer Glasfritte abgesaugt und mit 200 ml Puffer D gewaschen. Dieser Schritt wurde 5 mal mit der gleichen Menge an gepacktem Gel wiederholt. Zum letzten Filtrat wurde 20 µM cAMP gegeben und anschließend 10 ml gepacktes P-11 für jeden Liter Filtrat dazugegeben. Nachdem für 30 min gerührt

wurde, wurde das Gel auf einer Glasfritte abgesaugt und mit 10 Vol. Puffer D gewaschen. Das Gel wurde dann in einem gleichen Volumen Puffer D resuspendiert und in eine Säule geeigneter Größe eingefüllt. Die Säule wurde mit 2 Volumen Puffer D gewaschen und die Proteinkinase mit einem linearen Gradienten von 50-600 mM NaCl in Puffer D eluiert, der dem 10-fachen Volumen der Säule entsprach. Der Proteinpeak zwischen 0.2-0.3 M NaCl enthielt die katalytische Untereinheit. Die Fraktionen, die die Enzymaktivität enthielten, wurden gesammelt und extensiv gegen 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM DTE (Puffer E) dialysiert, bis die Leitfähigkeit ~ 1 mS betrug. Die dialysierte Fraktion wurde auf eine 5 ml STI-Sepharose 4B-Säule gepumpt, die in Puffer E äquilibriert worden war. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit 2 Volumen Puffer E gewaschen und die katalytische Untereinheit wurde durch 0.1 M NaCl in Puffer E von der Säule eluiert. Die zwei Fraktionen, die die Enzymaktivität enthielten, wurden gesammelt und gegen Puffer E/50% Glyzerin dialysiert und konzentriert. Die konzentrierte Enzymfraktion (70 µg/ml) wurde bei -20°C gelagert und war so für mindestens 6 Monate stabil.

2.2.7.2.1 Affinitätschromatographie der cGMP-abhängigen Proteinkinase an cAMP-Agarose

Das gelieferte Gel enthielt 3.7 µM cAMP/ml Agarose und wurde bei -20°C in 50% Glycerin aufbewahrt.

2 ml gepackte cAMP-Agarose wurde mit 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTE, 10 mM Benzamidin, 0.25 M Saccharose (Puffer F) voräquilibriert und direkt zu 150 ml 100 000xg Überstand (3.75 g Protein) gegeben, der zusätzlich 4 mM Theophyllin enthielt. Die Suspension wurde für 120 min bei 0°C gerührt, und das Gel auf einer kleinen Glasfritte gesammelt. Das Gel wurde nacheinander mit 200 ml

Puffer F, 200 ml Puffer F/2M NaCl und 100 ml Puffer F gewaschen. Das Gel wurde dann in 2 ml Puffer F resuspendiert und in eine 5 ml Säule eingefüllt. Zur Elution der cGMP-abhängigen Proteinkinase wurde die Säule mit 2 ml Puffer F/0.1 mM cGMP bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert und das Eluat bei 0°C auf Eis gesammelt. Diese Prozedur wurde 4 mal wiederholt, um die vollständige Elution des Enzyms von der Affinitätsmatrix zu gewährleisten. Die Enzymfraktionen wurden gesammelt und gegen Puffer F/50% Glyzerin dialysiert und konzentriert. Bei einer Konzentration von ~ 60 µg/ml konnte das Enzym bei -20°C mehrere Monate ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

Nach Gebrauch wurde die cAMP-Agarose mit 8M-Harnstoff gewaschen, um die gebundenen R-Untereinheiten der cAMP-Kinase zu eluieren, und so die volle Bindungskapazität zu erhalten.

2.2.7.2.2 Entfernung des cGMP durch Mikrozentrifugations-Entsalzung

Der Ansatz enthielt in einem Volumen von 0.5 ml: 200 µl cGMP-Kinase in Puffer F/50% Glyzerin (12 µg Protein), 1 mg BSA, 0.5 mM cAMP und 175 µl Puffer F. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min, wurde die Mikrozentrifugations-Entsalzung auf einer 5 ml Spritze, gefüllt mit voräquilibriertem Sephadex G-50 in Puffer F, wie in [53] beschrieben, durchgeführt.

2.2.7.3 Reinigung der Caseinkinase A

2.2.7.3.1 Hydroxylapatitchromatographie an HA-Ultrogel

Es wurde eine 30 ml Säule (Ø = 2.2 cm, H = 8 cm), die in 25 mM K-Phosphat Puffer pH 6.8, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE (Puffer G) voräquilibriert war, verwendet.

200 ml 100 000xg Überstand wurden an einer Phosphocellulose P-11 Säule chromatographiert, und die 0.6 M NaCl Caseinkinase A Fraktion (V = 90 ml) im Verhältnis 1:5 mit 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE (Puffer H) verdünnt (V = 500 ml). Die Fraktion wurde über Nacht mit einer Flußrate von 45 ml/h auf die HA-Ultrogel Säule gepumpt. Danach wurde mit Puffer G gewaschen, bis die OD_{280nm} < 0.02 war. Die Elution der Caseinkinase A erfolgte mit einem 2 x 100 ml Gradienten von 25 mM-0.5 M K-Phosphat Puffer pH 6.8, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTE.

2.2.7.3.2 Chromatographie an 5'-AMP-Sepharose 4B

Die Caseinkinase A Fraktion (V = 100 ml) der HA-Ultrogel Säule wurde 1:5 mit Puffer H verdünnt (V = 500 ml) und über Nacht auf eine 5'-AMP-Sepharose 4B Säule (Ø = 2.5 cm, H = 21 cm, V = 100 ml) mit einer Geschwindigkeit von 25 ml/h aufgepumpt. Es wurde mit Puffer H nachgewaschen und die Enzymaktivität wurde anschließend mit 300 ml Puffer H/1 M KCl eluiert.

2.2.7.3.3 Affinitätschromatographie an Casein-Sepharose 4B

Die Säule (Ø = 1.4 cm, H = 12 cm, V = 20 ml) wurde mit Puffer H voräquilibriert. Sowohl Peak I als auch Peak II der 5'-AMP-Sepharose 4B Säule, die bei -20°C in Puffer H/ 50% Glyzerin aufbewahrt wurden, wurden an Casein-Sepharose 4B chromatographiert. Die Elution der an die Säule geburdenen Enzymaktivität erfolgte mit einem 2 x 50 ml Gradienten von 0 - 1 M KCl in Puffer H, danach wurde mit 50 ml Puffer H/ 1 M KCl nachgewaschen. Die Caseinkinase Fraktionen wurden gesammelt und gegen Puffer H/50% Glyzerin dialysiert und konzentriert und bei -20°C aufbewahrt.

2.3 Analytische Methoden

2.3.1 Leitfähigkeitsmessungen

Die Bestimmung der Leitfähigkeit von NaCl, KCl- oder Kaliumphosphat ($K\text{-}PO_4$)haltigen Lösungen und Säulenfraktionen erfolgte mit dem Conductivity Meter CDM 3 der Firma Radiometer, Kopenhagen.

2.3.2 pH-Messungen

Zur Bestimmung des pH-Werts von Puffern und anderen Lösungen diente das Phillips pW 9410 digital pH Meter.

2.3.3 Proteinbestimmungsmethodem

2.3.3.1 Proteinbestimmung im Technicon-Autoanalyzer [54]

Vorbereitung der Probe:
Bei störenden Substanzen in der Probelösung - wie z.B. ME, DTE usw. - oder bei sehr geringen Proteinkonzentrationen (~ 10 µg/ml) mußte das Protein vor der Proteinbestimmung mit 10% TCA gefällt werden. Nach dem Abzentrifugieren (15 min in der Haematokrit, HERAEUS-CHRIST) wurde das Pellet in 1% SDS, 0.1 N NaOH aufgenommen.

Die Bestimmung erfolgte bei Raumtemperatur. Ein Aliquot der Probe wurde mit dem gleichen Volumen 0.1% $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, 0.24% Dinatriumtartrat$\cdot 2\ H_2O$, pH 7.0 vermischt. In einem Abstand von jeweils 1 Minute erfolgt zunächst der Zusatz eines 4.25-fachen Volumens 0.2 N NaOH, 2.12% Na_2CO_3 und dann der Zusatz eines gleichen Volumens Folin-Ciocalteau Reagenz (1:4 mit H_2O bidest verdünnt). Nach 5 min Inkubationszeit wird bei 660 nm die Protein-Konzentration photometrisch bestimmt. Die Eichung erfolgte mit Rinderserumalbumin als Standard.

2.3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford [55]

Herstellung des Farbstoff-Konzentrats:
200 mg Serva Blau G-250 wurden in 100 ml 95% Äthanol gelöst (37°C im Wasserbad). Dann wurden 200 ml 86%ige Ortho-Phosphorsäure dazugegeben und mit H_2O bidest auf 400 ml aufgefüllt. Das Konzentrat wurde bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt.

Meßbereich:

Makro 200 µg/ml - 1400 µg/ml

100 µl Probe + 5 ml Reagenz (1:4 mit H_2O bidest verdünnt) wurden gemischt und innerhalb von 60 min die OD_{595nm} gemessen.

Mikro 10 µg/ml - 200 µg/ml

800 µl Probe + 200 µl Reagenz (unverdünnt!) wurden gemischt und die OD_{595nm} innerhalb von 60 min gemessen.

2.3.4 Bestimmung der Proteinkinaseaktivität

2.3.4.1 cAMP-abhängige Proteinkinase

Der Reaktionsansatz (0.2 ml) enthielt: 50 mM MOPS pH 6.5, 10 mM Mg^{2+}, 0.1 mM [γ^{32}P]ATP (100-200 ipm/pmol), 1 mM DTE und 200 µg des Proteinsubstrats. cAMP und andere Effektoren wurden in den jeweils im Text angegebenen Konzentrationen dem Test zugesetzt.

2.3.4.2 cGMP-abhängige Proteinkinase

Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 0.2 ml:
50 mM MOPS pH 6.5, 50 mM Mg^{2+}, 0.2 mM [γ^{32}P]ATP (100-200 ipm/pmol), 50 mM ME und 200 µg des Proteinsubstrats. Wenn im Text vermerkt, wurden cGMP (0.1-5 µM) oder Calmodulin (100 µg) dem Test zugesetzt.

2.3.4.3 cAMP-unabhängige Proteinkinase

Wenn Histon oder Phosphorylase b als Substrat benutzt wurden, enthielt der Testansatz in einem Volumen von 0.2 ml: 50 mM MOPS pH 6.5 (8.0), 10 mM Mg^{2+} (75 mM Mg^{2+}) 0.1 mM [γ^{32}P]ATP (100-200 ipm/pmol), 1 mM DTE, 2 mg/ml Histon Typ IIa oder 5 mg/ml Phosphorylase b. Die Phosphorylierung von myosin light chains wurde durchgeführt in 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM Mg^{2+}, 1 mM DTE, 1 mM [γ^{32}P]ATP (100-200 ipm/pmol) und 4 mg/ml myosin light chains.

2.3.4.4 Caseinkinase

Der Reaktionsansatz (0.2 ml) enthielt:

50 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM Mg^{2+}, 1 mM DTE, 0.1 mM [γ^{32}P]ATP, 3 mg/ml dephosphoryliertes Casein.

Von allen Proben wurde die Autophosphorylierung, gemessen ohne zugesetztes Substrat, abgezogen.

Der Test wurde gestartet durch die Zugabe von 10-50 µl des jeweiligen Enzyms und die Inkubation wurde bei 30°C bis zu 30 min ausgeführt. Proben von 50 µl wurden zweifach entnommen, auf Glasfilterplättchen aufgetragen und nach einer Modifikation der Methode von Mans und Novelli [56] gewaschen. Wenn Histon H1 und Protamin als Substrat benutzt wurden, wurde eiskalte 25% TCA benutzt. Nach dem Trocknen der Filter wurde die proteingebundene Radioaktivität in 5 ml Toluol-Szintillator (2 l Toluol, 10 g PPO, 0.2 g POPOP) in einem Packard Tri-Carb Szintillationszähler bestimmt.

Definition der Enzymaktivität:

1 U der Enzymaktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die bei 30°C den Transfer von 1 nmol ^{32}P von [γ^{32}P]ATP auf das Proteinsubstrat pro min bewirkt.

2.3.5 Photoaffinitätsmarkierung von Proteinfraktionen mit 8-N_3-[^{32}P]cAMP [57]

Die Markierungsexperimente wurden in den Löchern einer Mikrotiterplatte bei 0-4°C durchgeführt. Während der Inkubation mit 8-N_3-[^{32}P]cAMP wurde die Platte mit Aluminiumfolie abgedeckt, um die Einwirkung von Licht zu verhindern.

Der Reaktionsansatz (0.1 ml) enthielt: 50 mM MES pH 6.2, 1 mM IBMX, 0.5 mM ME, 1 µM 8-N_3-[^{32}P]cAMP (5-10 Ci/mmol) und verschiedene Mengen an Protein bis zu 200 µg. Die Inkubationen werden gewöhnlich in Abwesenheit oder Gegenwart eines Überschusses an kaltem cAMP (50 µM) durchgeführt, um spezifische Markierungen zu erkennen.

Vor der Photolyse wurden die Ansätze 30-60 min in Dunkeln vorinkubiert, damit die reversible Bindung von 8-N_3-[^{32}P]cAMP ein Maximum erreicht. Die Proben wurden dann in einem Abstand von 4-8 cm für 10 min bei einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt (Fluotest Typ 5303, Original Hanau Quarzlampen GmbH, BRD).

Der kovalente Einbau von 8-N_3-[^{32}P]cAMP wurde durch Zählen von Säurepräzipitaten bestimmt. Zur SDS-Gelelektrophorese wurden pro 100 µl Ansatz 50 µl SDS-Probenpuffer dazupipettiert, 2 min bei 95°C denaturiert und entweder bei -20°C eingefroren oder sofort auf das Gel aufgetragen.

2.3.6 Elektrophoretische Methoden

2.3.6.1 Slabgel-Polyacrylamid-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) nach Laemmli [58]

Es wurden Plattengele (12.7 cm x 16.5 cm) mit Trenngelkonzentrationen von 10%/12% Acrylamid und Gradientengele von 7.5%-12% Acrylamidkonzentration benutzt.

Lösungen und Mischungsverhältnisse für SDS-Gele:

1) Lower-Gel (Trenngel)

	7.5 %	10 %	12 %
H_2O	19.35	16.12	13.4 ml
Lower-Tris (4 x)	10.0	10.0	10.0 ml
Acrylamid (30% + 0.8%)	10.0	13.3	16.6 ml
2% Amm.persul.	2.0	2.0	2.0 ml
TEMED	20	10	10 µl

2) Upper-Gel (Sammelgel):

	4 %
H_2O	3.0 ml
Upper Tris (4 x)	1.25 ml
Acrylamid (30% + 0.8%)	0.67 ml
2% Amm.persul.	75 µl
TEMED	5 µl

Pro Slab-Gel benötigt man ca. 30 ml Lower- und 6 ml Upper-Gel.

3) Lösungen: a) Acrylamidstammlösung
30 g Acrylamid,
0.8 g Methylenbisacrylamid,
mit H_2O bidest auf 100 ml auffüllen.

b) Lower-Tris (4 x) 1.5 M Tris/HCl pH 8.8
- 0.4% SDS
18.17 g Tris-Base
4 ml 10%iges SDS
12 N HCl
mit H_2O bidest auf 100 ml auffüllen,
pH 8.8 einstellen!

c) Upper-Tris (4 x) 0.5 M Tris/HCl pH 6.8 - 0.4% SDS

6.06 g Tris-Base
4 ml 10%iges SDS
12 N HCl
mit H_2O bidest auf 100 ml auffüllen,
pH 6.8 einstellen!

d) Probenpuffer:
10 ml Glyzerin
5 ml ß-Mercaptoäthanol
12.5 ml Upper-Tris (4 x)
mit H_2O bidest auf 100 ml auffüllen!

e) Ammoniumpersulfatlösung (alle 2 Tage frisch ansetzen)

100 mg Amm.persulfat
mit 5 ml H_2O bidest auffüllen! (2%ige Lösung)

f) Reservoirpuffer
6 g Tris-Base + 28.8 g Glycin + 20 ml 10%iges SDS mit H_2O bidest auf 2 l auffüllen!

g) TEMED - wird unverdünnt als 100%ige Lösung eingesetzt.

Probenaufbereitung:
Die Probe (0.1 µg - 5 µg pro Bande) wird in maximal 100 µl aufgenommen (neutraler bis leicht basischer pH). Dann wird für ca. 5-10 min im verschlossenen Eppendorfhütchen auf 100°C erhitzt. Nach anschließender Zugabe von 5 µl 0.1% Bromphenolblaulösung und kräftigem Mischen ist die Probe auftragsbereit.

Laufbedingungen: Strom zwischen 20 und max. 40 mA (Anfangsspannung 50 V). Dauer der Elektrophorese ca. 4-6 Std. (bis Bromphenolblau die untere Gelgrenze erreicht hat).

h) Färbelösung (1100 ml)
1.75 g Serva Brillant-Blau R-250
700 ml H_2O
300 ml Methanol
100 ml Eisessig

i) Entfärbelösung (1100 ml)
700 ml H_2O
300 ml Methanol
100 Eisessig

Die Gele wurden nach der Elektrophorese über Nacht gefärbt und dann in Entfärberlösung entfärbt und aufbewahrt.

2.3.6.2 Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen [59]

Die Elektrophorese wurde in Glasröhrchen (12 cm x 0.6 cm) mit einem 8 cm Trenngel und einem 1 cm Sammelgel durchgeführt. Zur Polymerisation wurde das Sammelgel 2 Stunden mit einer Neonlampe bestrahlt. Die Elektrophorese erfolgte bei 3 mA/Gel im Kühlraum bei +4°C.

Verwendete Gellösungen:

Sammelgel:

K 1	Acrylamid	5 g	pro 100 ml
	Bis	0.3 g	
K 2	1 M H_3PO_4	12.8 ml	pro 100 ml
	Tris-Base	2.85 g	pH 7.2
	TEMED	0.1 ml	
K 3	Riboflavin	2 mg	pro 100 ml
	Saccharose	40 g	

Trenngel:

A 1	Acrylamid	30 g	pro 100 ml
	Bis	0.4 g	
A 2	1 N HCl	24 ml	pro 100 ml
	Tris-Base	18.15 g	pH 8.9
	TEMED	0.4 ml	
A 3	Ammonium-persulfat	70 mg/100 ml	

Gelmischungen:

	Sammelgel	5%-Laufgel	
K 1	2 Teile	A 1	1 Teil
K 2	1 Teil	A 2	1 Teil
K 3	1 Teil	A 3	3 Teile
		H_2O	1 Teil

Reservoirpuffer (oben)	Tris-Base	6.32 g	pro 1 l
	Glycin	3.94 g	pH 8.9
Reservoirpuffer (unten)	Tris-Base	12.1 g	pro 1 l
	1 N HCl	50 ml	pH 8.1

2.3.7 Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität in nativen Röhrchengelen [60]

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele aus den Röhrchen entfernt und folgendermaßen weiterbehandelt:

	Temp./°C	Zeit/min	Vol./ml	Mix
1) Äquilibrierung	0	3 x 10	10	0.2 M MOPS pH 6.8
2) Vorinkubation	30	30	10	1)
3) Inkubation	30	30	10	2)

1) = 50 mM MOPS pH 6.8, 1 mM DTE, 10 mM Mg-acetat, 5 mg/ml Histon Typ IIa

2) = wie Vorinkubation + 10 µl[γ^{32}P]ATP ≙ 42 µCi

Nach der Inkubation wurde die Proteinkinase-Reaktion durch Überführen der Gele in 10% TCA gestoppt. Jedes Gel wurde über Nacht in 300 ml 10% TCA geschüttelt, und am anderen Morgen mit frischer 10% TCA für weitere 24 Stunden gewaschen. Die Entfernung der TCA in den Gelen erfolgte durch 3 x 1h Extraktion der Gele in 25% Methanol. Die Gele wurden dann mit einem Gelschneider in 2 mm Scheibchen geschnitten.

2.3.8 Bestimmung der [^{32}P]-Radioaktivität in Gelscheibchen

Die Gelscheibchen wurden direkt in 5 ml Toluol-Szintillator im Packard Tri-Carb Szintillationszähler gezählt.

2.3.9 Trocknen von Plattengelen

Nach der Elektrophorese und der Färbung und Entfärbung wurden die Gele zur Autoradiographie auf einem Geltrockner (Modell 224, Bio-Rad) für 1-2h getrocknet.

2.3.10 Autoradiographie von Plattengelen

Die Gele wurden nach dem Trocknen mit Plastik-Haushaltsfolie eingewickelt und ein Röntgenfilm daraufgelegt. Zur Markierung der exakten Position des Films wurde an 4 Stellen Film und Gel mit Hilfe einer Heftzwecke durchstochen. Die Belichtung erfolgte in einer Filmkassette (Dr. Goos) für 1 - 7 Tage bei -70°C mit oder ohne Verstärkerfolie.

2.3.11 Entwicklung der Röntgenfilme

Nach der Belichtung wurden die Filme bei Rotlicht in folgender Weise entwickelt:

1) Entwickler LX 24 (1:5 verdünnt mit H_2O):
   5 min
2) 1% Essigsäure: 30 sec
3) Fixierer AL 4 (1:5 verdünnt mit H_2O):
   8 - 10 min
4) Danach wurden die Filme für 30 min gewässert und dann an der Luft getrocknet.

3. Ergebnisse Teil A

3.1 Gelfiltration an Sephacryl S-300 in Gegenwart von 10 µM cAMP

3.1.1 Chromatographie von 100 Ü an Sephacryl S-300

Nach Auftrag eines 100 000xg Überstands (6 ml, 90 mg Protein), der mit 10 µM cAMP vorinkubiert worden war, auf die Sephacryl S-300 Säule, und Elution des Proteins, ergab sich ein Proteinkinase-Profil, das in Abb. 2A wiedergegeben ist. Die Analyse der Säulenfraktionen mit Casein und Histon Typ IIa als Substrat ergab zwei voneinander getrennte Caseinkinase-Aktivitäten in der Nähe des Ausschlußvolumens V_o (Abb. 2A, Peak I und III) und zwei mit Histon Typ IIa als Substrat meßbare Aktivitätspeaks (Abb. 2A, Peak II und IV). Ungefähr 80% der gesamten Histonkinase-Aktivität chromatographierte in einem Molekulargewichtsbereich ~ 40 000 D (Abb. 2A, Peak IV), der dem MG der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase entspricht. Etwa 20% der gesamten Histonkinase-Aktivität eluierte in der Nähe des Ausschlußvolumens V_o bei einem MG ~ 300 000 D zwischen den beiden Caseinkinase-Aktivitäten (Abb. 2A, Peak II).

Da die Position der Histonkinase-Aktivität des Peak II durch cAMP nicht zu niedrigerem Molekulargewicht verschoben werden konnte, und das MG ~ 300 000 D größer als das des Holoenzyms der cAMP-abhängigen Proteinkinase war, wurde zur Erhärtung der These, daß es sich nicht um eine cAMP-abhängige Proteinkinase handelt, der Einfluß steigender Konzentrationen von HSIP-Protein auf die Enzymaktivität des Peak II untersucht.
Das Ergebnis ist in Abb. 1 dargestellt:

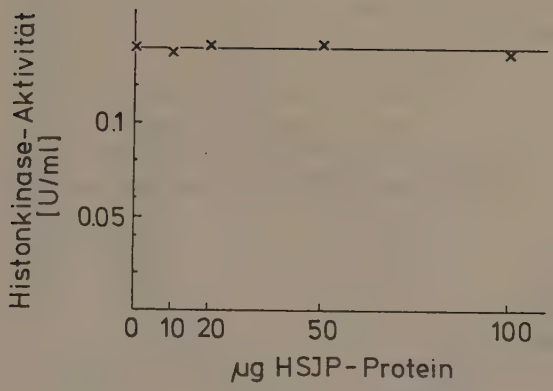

Abb. 1 Einfluß von HSIP-Protein auf die Histonkinase-Aktivität von Peak II

Es konnte keine Inhibierung der Enzymaktivität festgestellt werden, wie dies bei Messung des Holoenzyms oder der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase in Gegenwart von HSIP-Protein der Fall ist.

3.1.2 Chromatographie von 100 Ü an 5'-AMP-Sepharose 4B

Die Bestimmung der Histonkinase-Aktivitäten in den Fraktionen (Abb. 2B) zeigte, daß sich cAMP-abhängige Proteinkinase-Aktivität im Durchlauf der Säule befand. Die Enzymaktivität wurde durch Inkubation in Gegenwart von 10 µM cAMP 3.5-fach stimuliert, und durch eine Konzentration von 1 mg/ml HSIP-Protein inhibiert. Die Histonkinase-Aktivität, die von der Säule mit Puffer H/1 M KCl eluiert wurde, wurde weder durch 10 µM cAMP stimuliert, noch durch HSIP-Protein inhibiert (Tab. 1).

Tab. 1
Histonkinase-Aktivitäten im Durchlauf und im 1 M KCl Peak der 5'-AMP-Sepharose 4B Säule

Zusätze	eingebautes [^{32}P]-Phosphat (nmol x min^{-1} x mg Protein)	
	Durchlauf	1 M KCl Peak
keine	0.029	0.256
cAMP (10 µM)	0.139	0.256
cAMP (10 µM) + HSIP (1 mg/ml)	0.021	0.226

3.1.3 Chromatographie des 1 M KCl Peaks der 5'-AMP-Sepharose 4B Säule an Sephacryl S-300

Wenn die vereinigten und konzentrierten Fraktionen, die mit 1 M KCl von der 5'-AMP-Sepharose 4B Säule eluierten, mit 10 µM cAMP vorinkubiert und dann auf die Sephacryl S-300 Säule aufgetragen wurden, befand sich der größe Teil der Histonkinase-Aktivität (80%) (Abb. 2C, Peak I) in der gleichen Position wie die cAMP-unabhängige Histonkinase-Aktivität (Peak II, Abb. 2A) des 100 000xg Überstandes. Die Caseinkinase-Aktivität, die auch zu einem Teil an die 5'-AMP-Sepharose 4B Säule gebunden hatte, eluierte bis auf einen kleinen Teil (nahe V_o) in einem Bereich, der gegenüber dem Caseinkinase-Profil von 100 Ü (Abb. 2A) zu niedrigerem Molekulargewicht verschoben war. Diese ersten Versuche ergaben, daß der 100 000xg Überstand außer der cAMP-abhängigen Proteinkinase und Caseinkinase-Aktivität eine zusätzliche mit Histon Typ IIa meßbare Proteinkinase-Aktivität enthält, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit als cAMP-unabhängige Proteinkinase bezeichnet wird.

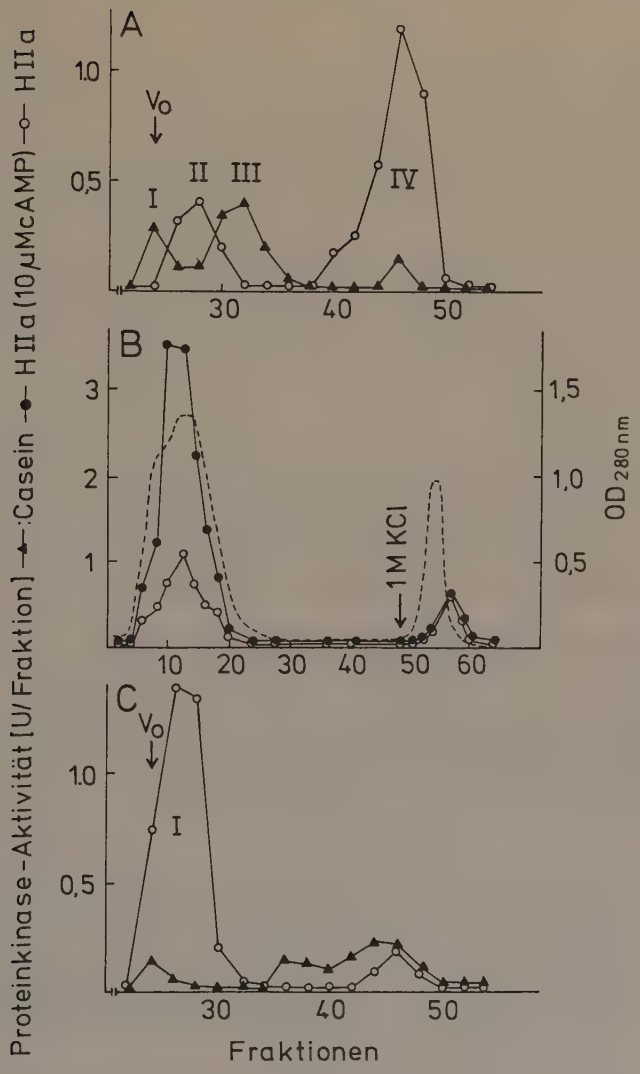

Abb. 2 Vergleich der Gelchromatographie an Sephacryl S-300 von 100 Ü (A) und 1 M KCl Peak der 5'-AMP-Sepharose 4B Säule (C) in Gegenwart von 10 µM cAMP. Chromatographie von 100 Ü an 5'-AMP-Sepharose 4B (B)

Legende zu Abb. 2

Die Casein (-▲-)- und Histonkinase (- o -, - ● -)-Aktivitäten wurden,wie in"Material und Methoden" beschrieben, bestimmt.

A: Nach Vorinkubation für 30 min bei 4°C mit 10 µM cAMP wurde der 100 Ü (90 mg Protein) auf die Sephacryl S-300 Säule aufgetragen (2.5 cm x 132 cm, V = 700 ml), die in Puffer A (siehe 2.2.5.1) voräquilibriert worden war. Das Protein wurde mit dem gleichen Puffer eluiert.

B: 100 Ü, der an einer Sephadex G-50 Säule entsalzt worden war (416 mg Protein), wurde auf die in Puffer H (siehe 2.2.7.3.2) voräquilibrierte Affinitätssäule (2.5 cm x 21 cm, V = 100 ml) aufgetragen. Das Protein wurde mit Puffer H eluiert (Durchlauf-Fraktionen), gefolgt von der Elution mit Puffer H/1 M KCl (1 M KCl Peak).

C: Die Protein Fraktionen, die von der 5'-AMP-Sepharose 4B Säule mit 1 M KCl eluiert wurden, wurden gesammelt, auf etwa 10 ml konzentriert, und 30 min bei 4°C mit 10 µM cAMP vorinkubiert. Die Probe (10 ml, 22.4 mg Protein) wurde auf die Säule aufgetragen und mit Puffer A eluiert.

3.2 Chromatographie von 100 Ü an Phosphocellulose P-11

3.2.1 Vergleich des Elutionsprofils der Proteinkinasen durch Salzstufenelution und kombinierte Stufen- und Gradientenelution

10 ml 100 Ü (Homogenisationspuffer A) wurden auf die in Puffer C (siehe 2.2.5.3) voräquilibrierte Säule aufgetragen (Abb. 3A). Der Durchlauf und Nachwasch enthielt den größten Teil der cAMP-abhängigen Proteinkinase (~ 7-fache Stimulierung durch 10 µM cAMP im Test) und entsprach ~ 85% der von der Säule eluierbaren Histonkinase-Aktivität. Durch Waschen

mit Puffer C/0.2 M NaCl wurde eine weitere, durch cAMP schwach (1 - 1.7-fach) stimulierbare Histonkinaseaktivität eluiert. Durch Salzstöße von 0.6 M NaCl und 1 M NaCl in Puffer C konnten dann nacheinander Caseinkinase A (0.6 M NaCl) und Caseinkinase G (1 M NaCl) eluiert werden. Die spezifische Aktivität der Caseinkinase G war mit ~ 5 U/mg bei mehreren Aufarbeitungen identisch, wohingegen die spezifische Aktivität der Caseinkinase A bei mehreren Säulenläufen zwischen 0.1 - 0.7 U/mg variierte. Die Caseinkinase-Peaks konnten gegen Puffer C/50% Glycerin konzentriert werden und bei -20°C ohne Aktivitätsverluste aufbewahrt werden.

Der Vergleich zeigt in Abb. 3B das Profil einer P-11 Säule, die mit 100 ml 100 Ü (Homogenisationspuffer A) beladen wurde. Der Durchlauf enthielt wieder durch 10 µM cAMP 7 - 8-fache stimulierbare Histonkinase-Aktivität. Die weitere Elution erfolgte dann im Unterschied zu Abb. 3A mit Puffer C/0.2 M NaCl, einem linearen Gradienten von 0.2 M NaCl - 0.4 M NaCl in Puffer C und einem Salzstoß von Puffer C/0.6 M NaCl. Durch den linearen Gradienten wurde der durch 0.2 M NaCl in Abb. 3A eluierte zweite Histonkinasepeak in drei distinkte Histonkinasepeaks aufgetrennt, die nacheinander bei 0.2 M NaCl, 0.22 M NaCl und 0.28 M NaCl eluierten und mit HK I, HK II und HK III bezeichnet wurden. Die drei Peaks wurden gegen Puffer C/50% Glycerin dialysiert und konzentriert und bei -20°C mehrere Monate ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt. Die spezifischen Aktivitäten der drei konzentrierten Peaks betrugen HK I (0.56 U/mg), HK II (0.43 U/mg) und HK III (1.3 U/mg).

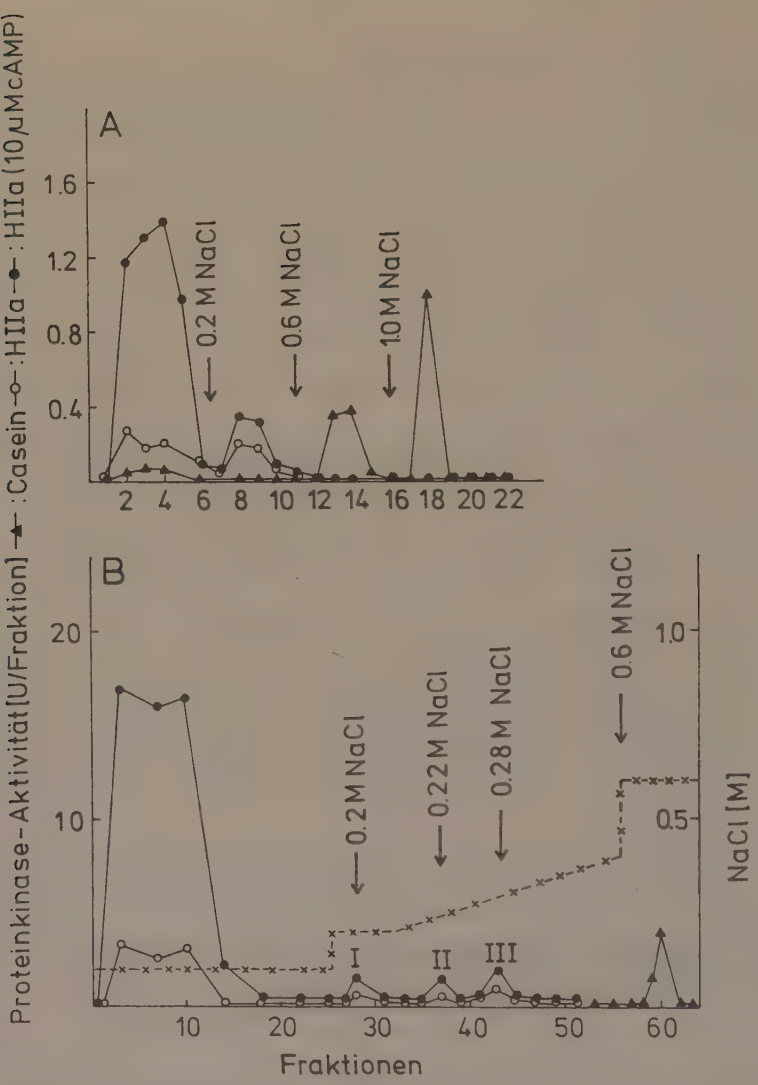

Abb. 3 Chromatographie von 100 Ü an Phosphocellulose P-11

Vergleich von Salzstufenelution (A) mit kombinierter Stufen und Gradientenelution (B)

Legende zu Abb. 3

A: 10 ml 100 Ü (165 mg Protein) wurden auf die P-11 Säule (1 cm x 10 cm, V = 8 ml), die in Puffer C äquilibriert worden war, aufgetragen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit Puffer C/0.2 M NaCl, Puffer C/0.6 M NaCl und Puffer C/1 M NaCl.

B: 100 ml 100 Ü (1.65 g Protein) wurden auf die P-11 Säule (2 cm x 8 cm, V = 25 ml), die in Puffer C äquilibriert worden war, aufgetragen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit Puffer C/0.2 M NaCl, einem linearen Gradienten (2 x 125 ml) von 0.2 - 0.4 M NaCl in Puffer C und mit Puffer C/0.6 M NaCl.

Die Proteinkinase-Aktivitäten der einzelnen Fraktionen wurden nach 2.3.4 in "Material und Methoden" mit Casein (- ▲ -), Histon Typ IIa (- o -) und Histon Typ IIa, 10 µM cAMP (- ● -) bestimmt.

3.2.2 Untersuchung der drei Histonkinase-Aktivitäten des 0.2 - 0.4 M NaCl Bereichs der Phosphocellulose P-11 Säule

Zur Klärung der cAMP-Abhängigkeit der drei Peaks HK I, HK II und HK III (Abb. 3B) und ob durch diese Aktivitäten cAMP-unabhängige Histonkinasen überdeckt wurden, wurden folgende Versuche gemacht.

3.2.2.1 Native Gelelektrophorese nach Davies

Die native Gelelektrophorese nach Davies wurde wie in 2.3.6.2 beschrieben durchgeführt. Je eine Probe von HK I, HK II und HK III (je 300 µg Protein) wurde entweder sofort oder nach 30 min Inkubation bei 4°C mit 10 µM cAMP zur Dissoziation

des cAMP-abhängigen Holoenzyms, auf die Gele aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde der Kinase-Test direkt im Gel mit Histon Typ IIa als Substrat nach 2.3.7 durchgeführt. In Abb. 4 ist der Radioaktivitätseinbau von HK I (A), HK II (B) und HK III (C) pro Gelscheibchen gegen den R_f-Wert aufgetragen. Ohne Vorinkubation mit 10 µM cAMP betrugen die R_f-Werte der Histonkinase-Peaks für
HK I (A): 0.75; 0.85; 0.95.
HK II (B): 0.55; 0.75; 0.85.
HK III(C): 0.65; 0.85.

Nach Vorinkubation mit 10 µM cAMP vor der Elektrophorese wurde eine Verschiebung der Histonkinase-Aktivität für alle 3 Proben zu niedrigerem R_f-Wert beobachtet.
Die R_f-Werte betrugen:

HK I (A): 0.35
HK II (B): 0.35; 0.5
HK III (C): 0.35; 0.5

Die Hb-Bande (Hämoglobin) diente als Marker und wurde als letztes Gelscheibchen geschnitten.

3.2.2.2 Photoaffinitätsmarkierung mit 8-N_3-[^{32}P]cAMP. Vergleich mit 100 Ü vom Rind, Ratte und Y1 Zellen

Zur Identifizierung cAMP-bindender Untereinheiten (R-Untereinheiten) wurde die Photoaffinitätsmarkierung der drei Peaks (HK I, HK II, HK III) nach 2.3.5 durchgeführt und mit der Markierung von 100 Ü vom Rind, der Ratte und Y1-Zellen verglichen. Nach der Photoaffinitätsmarkierung wurde mit den Fraktionen eine 10%-Slabgel-SDS-Elektrophorese mit anschließender Autoradiographie durchgeführt. In allen 3 Histonkinase Peaks (HK I, HK II und HK III) waren alle Typen regulatorischer Untereinheiten mit den folgenden Molekulargewichten spezifisch markiert (R_I = 49 K, R_{II} = 54 K, R_{II}^* = 57 K). Die Markierung dieser Banden konnte

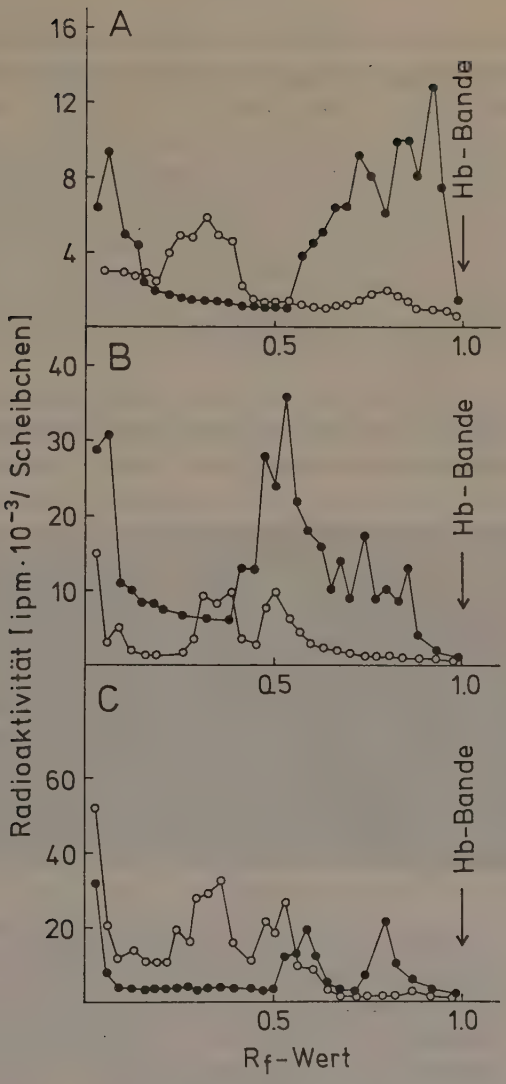

Abb. 4 Native Elektrophorese von HK I (A), HK II (B) und HK III (C) ohne (- ● -) und nach Vorinkubation mit 10 µM cAMP (- o -)

durch eine Vorinkubation mit 50 µM cAMP unterdrückt werden (Spalten 1-3, Abb. 5). Im 100 Ü des Rindes (Homogenisationspuffer B) war die R_I-Untereinheit (R_I = 49 K) spezifisch markiert, wohingegen die Markierung der im 54 K-Bereich markierten Bande nicht durch einen Überschuß an kaltem cAMP unterdrückt werden konnte. Dies deutete auf ein unspezifisch bindendes Protein hin, ebenso wie die Markierung der 37 K-Bande, die nur im 100 Ü des Rindes zu verzeichnen war (Spalte 4, Abb. 5). Das Ratten-Cytosol enthielt nur eine spezifisch markierte Bande (R_I = 49 K) (Spalte 5, Abb. 5).

Im 100 Ü von Y1-Zellen war außer der R_I-Bande ein weiteres Protein spezifisch markiert (R_{II} = 52 K) (Spalte 6, Abb. 5).

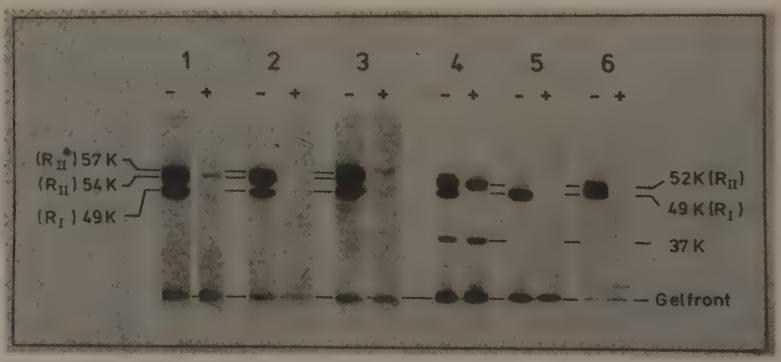

Abb. 5 Photoaffinitätsmarkierung mit 8-N_3-[^{32}P]cAMP. Die Proben wurden mit 1 µM 8-N_3-[^{32}P]cAMP unter Standardbedingungen (siehe 2.3.5) ohne (-) und in Gegenwart (+) von 50 µM cAMP markiert und durch SDS-Gelelektrophorese (10%) mit anschließender Autoradiographie analysiert.
Auftrag:
Spalte 1: 100 µg HK I; Spalte 2: 100 µg HK II; Spalte 3: 100 µg HK III; Spalte 4: 300 µg 100 Ü vom Rind; Spalte 5: 300 µg 100 Ü aus Ratte; Spalte 6: 240 µg 100 Ü von Y1-Zellen.

3.2.3 Einfluß von Triton X-100 und Proteaseinhibitoren auf das Proteinkinase-Profil der P-11 Säule

25 ml 100 Ü vom Rind (Homogenisationspuffer A)/0.1 M NaCl wurde unter verschiedenen Bedingungen über Nacht vorinkubiert und an drei P-11 Säulen identischen Volumens chromatographiert (Abb. 6). Der 100 Ü, der als Kontrolle diente, wurde über Nacht bei 4°C ohne Zusätze stehengelassen und dann auf die Säule aufgetragen (Abb. 6A). Der Einfluß von Triton X-100 auf das Proteinkinase-Profil ist in Abb. 6B dargestellt. Der 100 Ü (25 ml) wurde über Nacht mit 2% Triton X-100 vorinkubiert, und dann auf die mit Puffer C/ 0.03% Triton X-100 voräquilibrierte Säule aufgetragen. Die Beeinflussung der Proteinkinase-Aktivitäten durch Proteaseinhibitoren zeigt Abb. 6C. Der dritte Säulenlauf wurde mit 100 Ü vorgenommen, der über Nacht in Puffer C/ 0.1 mM TPCK, 0.1 mM TLCK, 0.1 mM Benzamidin und 0.1 mM PMSF vorinkubiert worden war. Nach dem Sammeln des Durchlaufs wurden die gebundenen Proteinkinase-Aktivitäten der einzelnen Säulen mit einem linearen Gradienten von 0.1 - 0.7 M NaCl in Puffer C eluiert. In Gegenwart von Triton X-100 war die Basalaktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase im Durchlauf auf der Säule gegenüber der Kontrolle 2-fach erhöht, während sie in Gegenwart von Protease-Inhibitoren um einen Faktor 3 erniedrigt war.

Sowohl Triton X-100 als auch die Proteaseinhibitoren hatten einen geringen Einfluß auf die Stimulierung der bei 0.25 M NaCl eluierten Histonkinase-Aktivität durch 10 µM cAMP. Der Aktivierungsfaktor schwankte von 2.5 (Kontrolle Abb. 6A) bis zu 1.8 - 1.2-fach (Triton X-100 Säule Abb. 6B, Proteaseinhibitor Säule Abb. 6C).

Auf die bei 0.5 - 0.52 M NaCl eluierte Caseinkinase-Aktivität (Caseinkinase A) hatte sowohl die Vorbehandlung des 100 Ü mit Triton X-100 als auch die mit Proteaseinhibitoren einen deutlichen Effekt. In der Kontrolle (Abb. 6A) ist bei 0.5 M NaCl ein breiter Caseinkinase-Peak zu sehen

(4.3 U), der von zwei weiteren, flachen Vorpeaks bei 0.25 M NaCl und 0.4 M NaCl begleitet wird. Nach Vorinkubation mit Triton X-100 war die Aktivität des Caseinkinase-Peaks (9.7 U) gegenüber der Kontrolle 2.3-fach erhöht und der Peak zeigte eine weitaus deutlichere Ausprägung. In Gegenwart von Proteaseinhibitoren war die Aktivität der Caseinkinase A kaum noch meßbar (0.5 U) und gegenüber der Kontrolle um einen Faktor 9 verringert und die Vorpeaks bei 0.25 und 0.4 M NaCl vollständig verschwunden.

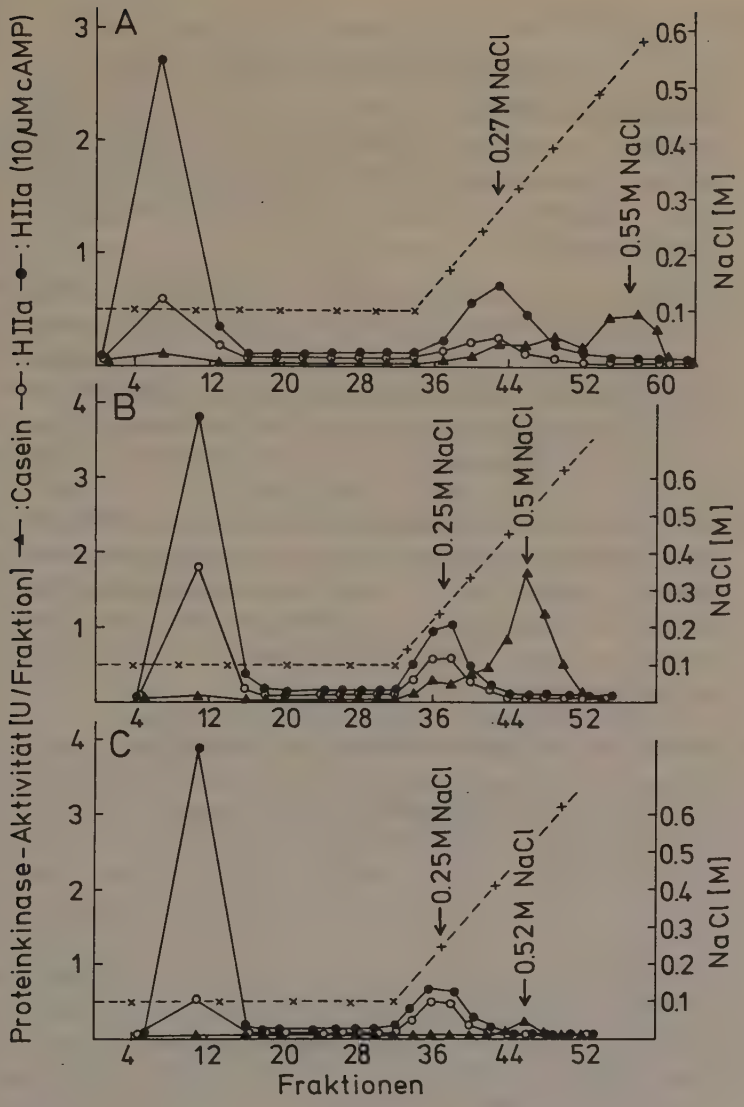

Abb. 6 Einfluß von Triton X-100 (B) und von Protease-inhibitoren (C) auf das Proteinkinase-Profil der P-11 Säule

Legende zu Abb. 6

A: 25 ml 100 Ü/0.1 M NaCl wurden auf die in Puffer C äquilibrierte Säule (1.5 cm x 7 cm, V = 12.3 ml) aufgetragen. Die Elution der gebundenen Proteinkinase-Aktivitäten erfolgte durch einen linearen Gradienten von 0.1 - 0.7 M NaCl in Puffer C. Es wurden Fraktionen à 3 ml gesammelt.

B: 25 ml 100 Ü/0.1 M NaCl/2% Triton X-100 wurden auf die in Puffer C/0.03% Triton X-100 voräquilibrierte Säule (1.5 cm x 7 cm, V = 12.3 ml) aufgetragen. Die Elution der gebundenen Proteinkinase-Aktivitäten erfolgte wie in A in Puffer C/0.03% Triton X-100. Es wurden Fraktionen à 5 ml gesammelt.

C: 25 ml 100 Ü/0.1 M NaCl/Proteaseinhibitoren wurden auf die in Puffer C/Proteaseinhibitoren voräquilibrierte Säule (1.5 cm x 7 cm, V = 12.3 ml) aufgetragen. Die Elution der gebundenen Proteinkinase-Aktivitäten erfolgte wie in A in Puffer C/Proteaseinhibitoren. Es wurden Fraktionen à 5 ml gesammelt.

Die Proteinkinase-Aktivitäten der einzelnen Fraktionen wurden nach 2.3.4 mit Casein (-▲-), Histon Typ IIa (- o -) und Histon Typ IIa, 10 µM cAMP (- ● -) gemessen.

3.2.4 Der Effekt von Proteaseinhibitoren und NEM auf die Aktivität der Caseinkinase A

Da nach Vorbehandlung von 100 Ü mit Proteaseinhibitoren kaum noch eine Caseinkinase A-Aktivität meßbar war (siehe 3.2.3, Abb. 6B), wurde der Einfluß von Proteaseinhibitoren und NEM im Konzentrationsbereich von 1 µM bis 1 mM direkt auf eine bereits vorhandene Caseinkinase A-Aktivität (Fr. 54, Abb. 6A) untersucht. Die Proben wurden ohne Substrate (ATP, Casein) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Proteaseinhibitoren und NEM vorinkubiert und anschließend die Caseinkinase A-Aktivität gemessen. Keiner der verwendeten Proteaseinhibitoren hatte im verwendeten Konzentrationsbereich einen hemmenden Effekt auf die Caseinkinase A-Aktivität. Im Gegensatz dazu wurde die Enzymaktivität durch Vorinkubation mit 10 µM NEM auf 60%, mit 1 mM NEM auf 30% der ursprünglichen Aktivität inhibiert. Das Ergebnis ist in Abb. 7 darstellt.

3.3 Endogene Phosphorylierung des Durchlaufs und des 1 M NaCl-Eluats einer Phosphocellulose P-11 Säule

3 ml 100 Ü (36 mg Protein) wurden auf einer G-25 Säule (BV = 25 ml) in Puffer C von niedermolekularen Substanzen befreit und die Spitzenfraktionen des Durchlaufs auf eine 3 ml Phosphocellulose P-11 Säule aufgetragen. Die Spitzenfraktion des Durchlaufs (1 ml/3 mg Protein) und der 1 M NaCl Peak (1 ml/0.24 mg Protein) der P-11 Säule wurden über Nacht in Ultrohülsen gegen je 100 ml Phosphorylierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM Mg^{2+}, 2 mM DTE, 1 mM EDTA, 1 mM Theophyllin) dialysiert. Zur endogenen Phosphorylierung wurden je 500 µl Durchlauf und 500 µl 1 M NaCl Eluat mit 20 µl $\gamma[^{32}P]$ATP (34 µCi) versetzt und der Phosphateinbau durch eine Zeitkinetik von 1-15 min verfolgt.

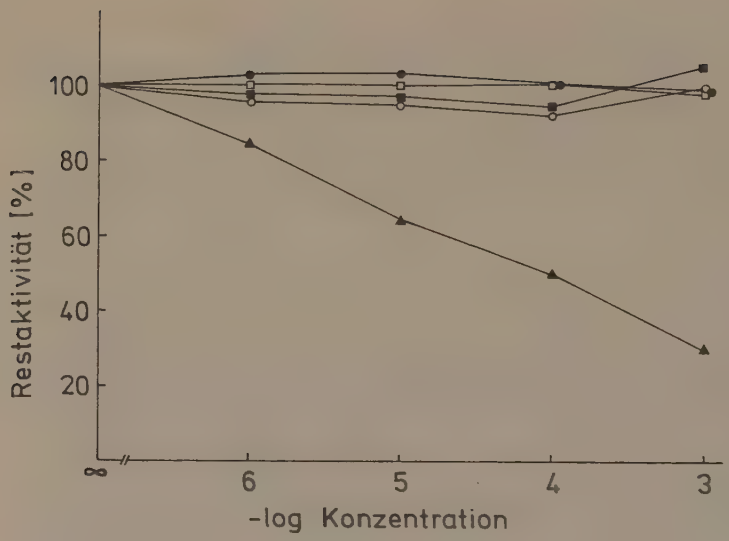

Abb. 7 Effekt von Proteaseinhibitoren und NEM auf die Caseinkinase A-Aktivität

Die Proben (20 µl Enzym) wurden für 60 min bei 20°C mit TLCK (□-□), TPCK (■-■), Benzamidin (o - o), PMSF (● - ●) und NEM (▲-▲) vorinkubiert und die Caseinkinase A-Aktivität nach 2.3.4.4 bestimmt.

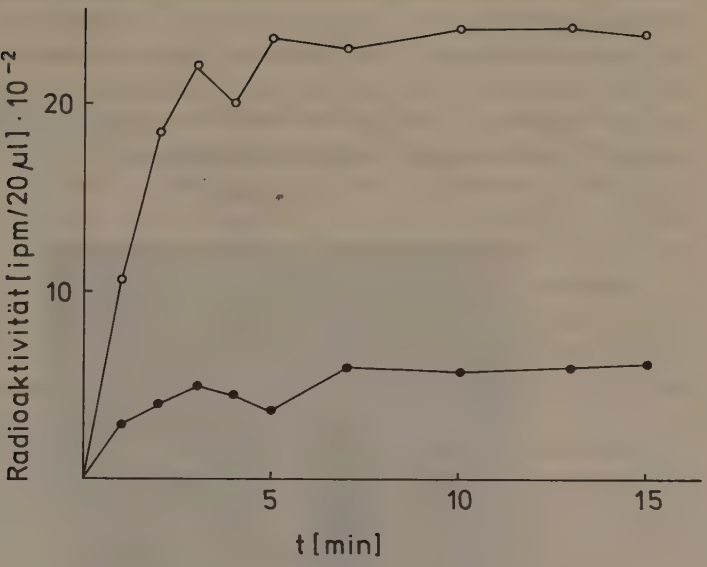

Abb. 8 Zeitkinetik der endogenen Phosphorylierung von Durchlauf und 1 M NaCl Eluat der P-11 Säule

Es wurden jeweils 20 µl Aliquote auf Glasfaserfilter aufgetragen und der [^{32}P]-Phosphateinbau wie in 2.3.4 bestimmt.
o - o : [^{32}P]-Phosphateinbau im Durchlauf
● - ● : [^{32}P]-Phosphateinbau im 1 M NaCl Peak

Der maximale [^{32}P]-Phosphateinbau war bereits nach 3 min erreicht und blieb dann bis zu einem Zeitpunkt von 15 min annähernd konstant. Die Bestimmung des Molekulargewichts radioaktiv markierter Proteinbanden im Durchlauf und im 1M NaCl Eluat erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese (10% Acrylamid) und anschließender Autoradiographie. Je eine Probe des Durchlaufs (20 µl/30 µg) und des 1 M NaCl Eluats (50 µl/24 µg) wurde nach 10 min Phosphorylierungszeit entnommen, mit dem gleichen Volumen SDS-Probenpuffer

versetzt und nach der Denaturierung auf das Gel aufgetragen (Abb. 9).
Die Molekulargewichte der prominent phosphorylierten Banden im Durchlauf (Abb. 9, Spalte 1) betrugen 120 K, 95 K, 86 K, 76 K, 66 K, 56 K und 46 K. Im 1 M NaCl Eluat (Abb. 9, Spalte 2) waren Banden vom Molekulargewicht 135 K, 115 K, 82 K, 65 K, 57 K und 45 K phosphoryliert.

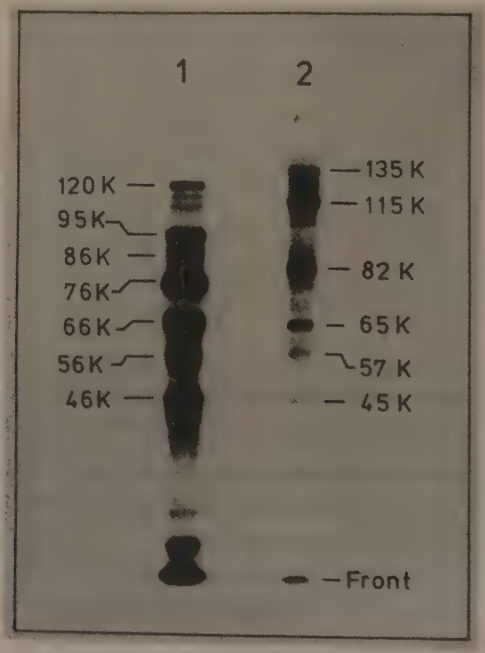

Abb. 9 Autoradiographie von Durchlauf und 1 M NaCl Eluat der P-11 Säule

Spalte 1: 30 µg (2100 ipm) Durchlauf-Fraktion
Spalte 2: 24 µg (710 ipm) 1 M NaCl Eluat

Als Eichproteine zur Molekulargewichtsbestimmung wurden Phosphorylase b (97 K), BSA (68 K), Ovalbumin (42 K) und LDH (35 K) verwendet.

3.4 Chromatographie eines Phosphocellulose P-11 Durchlaufs an DEAE-Cellulose (DE-52) in Gegenwart von 10 µM cAMP

200 ml 100 Ü (4.2 g Protein)/0.2 M NaCl wurden auf eine in Puffer C äquilibrierte Phosphocellulose P-11 Säule (BV = 51.2 ml) aufgetragen und die Caseinkinasen wie in 3.2.1 beschrieben abgetrennt. Der Durchlauf der P-11 Säule (V = 290 ml) wurde auf ein Volumen von 1200 ml mit Puffer E verdünnt (L ~ 6 mS). Zur Dissoziation des Holoenzyms der cAMP-abhängigen Proteinkinase wurde der verdünnte Durchlauf der P-11 Säule mit 10 µM cAMP für 30 min bei 4°C vorinkubiert und anschließend auf die in Puffer E / 10 µM cAMP äquilibrierte DE-52 Säule (2.6 cm x 27 cm, BV = 143 ml) mit einer Flußrate von 100 ml/h aufgepumpt. Nach dem Sammeln des Durchlaufs wurden die an die Säule gebundenen Proteinkinase-Aktivitäten mit einem linearen Gradienten (2 x 600 ml) von 0 - 0.4 M NaCl in Puffer E eluiert (Abb. 10). Die Analyse der Säulenfraktionen mit Histon Typ IIa als Substrat ergab, daß sich die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase im Durchlauf der DE-52 Säule befand. Mit steigender Salzkonzentration wurden durch den Gradienten bei 0.095 M NaCl, 0.15 M NaCl und 0.22 M NaCl nacheinander 3 mit Histon Typ IIa meßbare Histonkinase-Peaks eluiert (Abb. 10, I, II, III). Die mit I bezeichnete Aktivität (0.095 M NaCl) erwies sich als Restaktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase. Peak II (0.15 M NaCl) wurde in diesem Versuch nicht näher charakterisiert und Peak III (0.22 M NaCl) zeigte Eigenschaften einer cAMP-unabhängigen Histonkinase, da die Aktivität weder durch cAMP stimulierbar, noch durch HSIP-Protein hemmbar war. Dies war nach dem Ergebnis der Chromatographie von 100 Ü an 5'-AMP-Sepharose 4B (3.1.2) der zweite Hinweis auf eine cAMP-unabhängige Proteinkinase in der Nebennierenrinde des Rindes. Die Ergebnisse der Analyse der einzelnen Aufarbeitungsschritte sind in Tabelle 2 dargestellt.

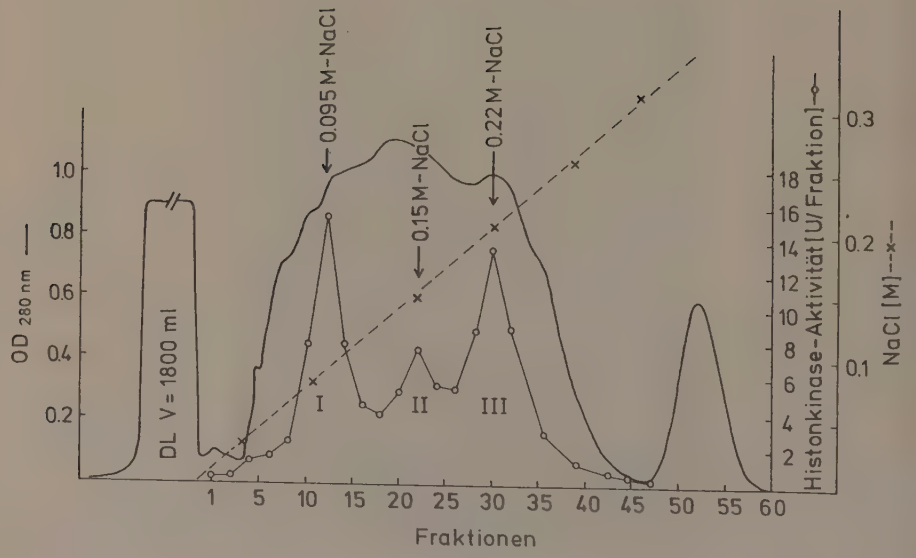

Abb. 10 Chromatographie eines Phosphocellulose P-11 Durchlaufs an DEAE-Cellulose (DE-52) in Gegenwart von 10 µM cAMP

Tab. 2

Test der verschiedenen Aufarbeitungsstufen bis zur DE-52 Chromatographie in Gegenwart von 10 µM cAMP

Fraktion		Volumen (ml)	Aktivität (U)
100 000xg Überstand	- cAMP	200	32
	+ 10 µM cAMP	200	64
	+ 10 µM cAMP + 50 µg HSIP	200	32
Durchlauf P-11 Säule	- cAMP	300	21
	+ 10 µM cAMP	300	60
	+ 10 µM cAMP + 50 µg HSIP	300	19.5
Durchlauf DE-52 Säule	- cAMP	1900	351
	+ 10 µM cAMP	1900	320
	+ 10 µM cAMP + 50 µg HSIP	1900	3.8
0.22 M-NaCl Eluat Peak III DE-52	- cAMP	100	33
	+ 10 µM cAMP	100	34
	+ 10 µM cAMP + 50 µg HSIP	100	33

3.5. DE-52 Chromatographie von 100 Ü nach pH 5.5 Fällung

Der nach 2.2.6 präzipitierte 100 Ü (Homogenisationspuffer B) wurde in einem Volumen von 60 ml auf die in Puffer E äquilibrierte DE-52 Säule (BV = 54 ml) mit einer Flußrate von 54 ml/h aufgetragen. Nach dem Sammeln der Durchlauf- und Nachwaschfraktionen wurden die gebundenen Proteinkinasen mit einem 2 x 250 ml Gradienten von 0 - 0.4 M NaCl in Puffer E eluiert. Die Analyse der Histonkinase-Aktivitäten der Säulenfraktionen mit Histon H 1 als Substrat ohne und in Gegenwart von 0.1 µM cGMP ergab 3 Peaks (Abb. 11, I, II, III), von denen der mittlere (0.15 M NaCl) 3.5-fach durch 0.1 µM cGMP stimulierbar war. Peak I (0.08 M NaCl) wurde durch cGMP nicht stimuliert, und ist vermutlich, wie das Ergebnis von Versuch 3.4 zeigte, eine kleine Restaktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase. Peak III (0.22 M NaCl) eluierte bei der gleichen Ionenstärke wie die cAMP-unabhängige Histonkinase-Aktivität in Versuch 3.4. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigte, daß es sich bei Peak II (0.15 M NaCl) in 3.4, der im vorangegangenen Versuch nicht weiter charakterisiert wurde, um eine cGMP-abhängige Proteinkinase handelte, und daß die in Kapitel 3.4 beschriebene cAMP-unabhängige Proteinkinase auf Grund ihrer physikalischen Eigenschaften ebenfalls durch eine Säurefällung präzipitiert werden kann.

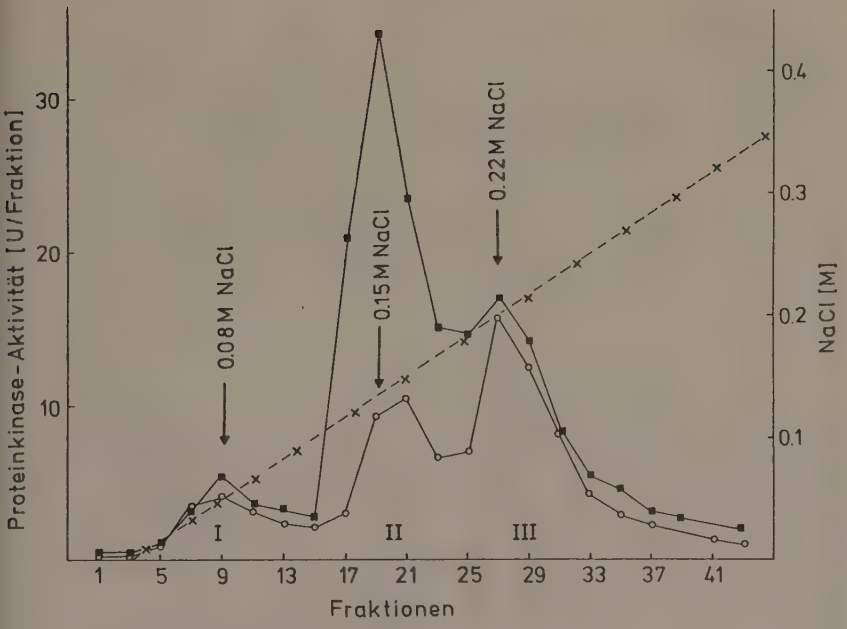

Abb. 11 DE-52 Chromatographie von 100 Ü nach pH 5.5 Fällung

\+ 0.1 µM cGMP (- ■ -)

\- cGMP (- o -)

4. Ergebnisse Teil B

4.1 Caseinkinase A

Eine ausführliche Beschreibung der Reinigungsprozedur ist in "Material und Methoden" (2.2.7.3) wiedergegeben.

4.1.1 Chromatographie an Hydroxylapatit (HA-Ultrogel)

Als Startmaterial wurde die 0.6 M NaCl-Fraktion einer Phosphocellulose P-11 Säule verwendet, die mit 200 ml 100 Ü (Homogenisationspuffer A)/0.1 M NaCl beladen worden war. Nach der Verdünnung mit Puffer H (1:5) wurde die gesamte Caseinkinase-Aktivität an die HA-Ultrogel Säule gebunden und durch einen linearen Phosphat-Gradienten in einem Peak (0.2 M-Phosphat) eluiert (Abb. 12A).

4.1.2 Chromatographie an 5'-AMP-Sepharose 4B

Die Caseinkinase-Fraktion der Hydroxylapatit Säule wurde nach der Verdünnung mit Puffer H (1:5) an eine 5'-AMP-Sepharose 4B Säule gebunden. Bei der Elution der Caseinkinase A-Aktivität mit 1 M KCl/Puffer H waren zwei Peaks zu beobachten (Abb. 12B, Peak I, Peak II). Der größte Teil des Proteins, das an die 5'-AMP-Sepharose 4B Säule gebunden hatte, befand sich im ersten Aktivitäts-Peak, wohingegen der zweite Peak sehr wenig Protein enthielt (Abb. 12B, Peak I, Peak II).

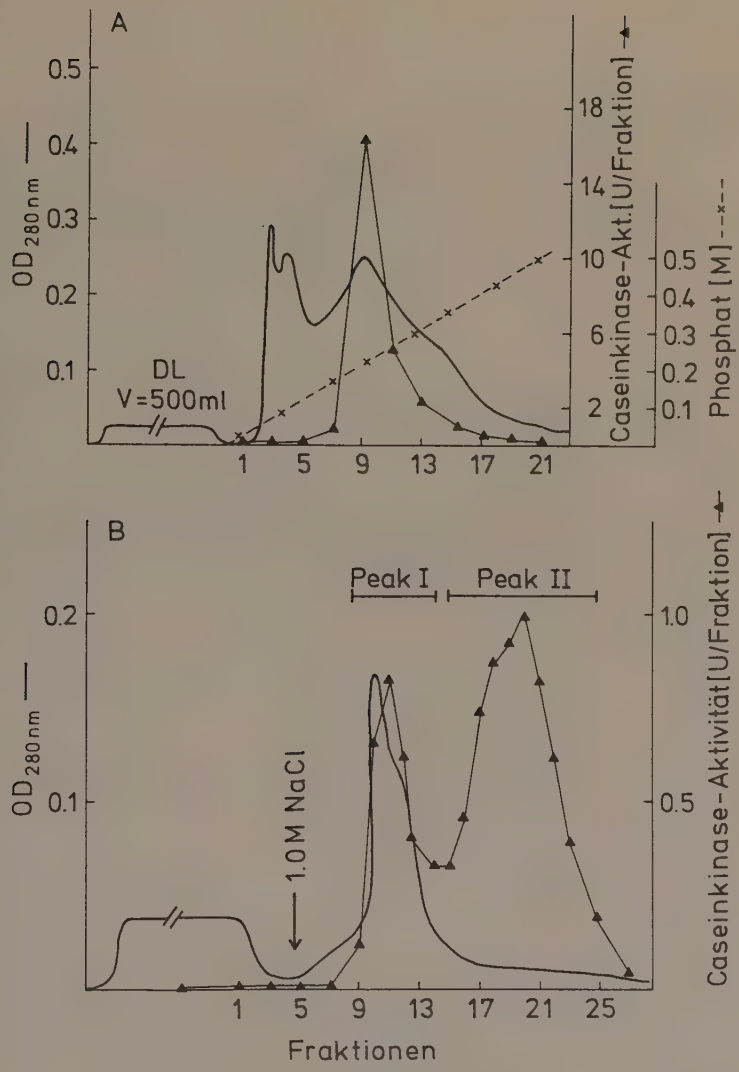

Abb. 12 A: Chromatographie des 0.6 M NaCl-Peaks der P-11 Säule an Hydroxylapatit (HA-Ultrogel)
B: Chromatographie der Caseinkinase A-Aktivität der HA-Ultrogel Säule (0.20 M Phosphat) an 5'-AMP-Sepharose 4B

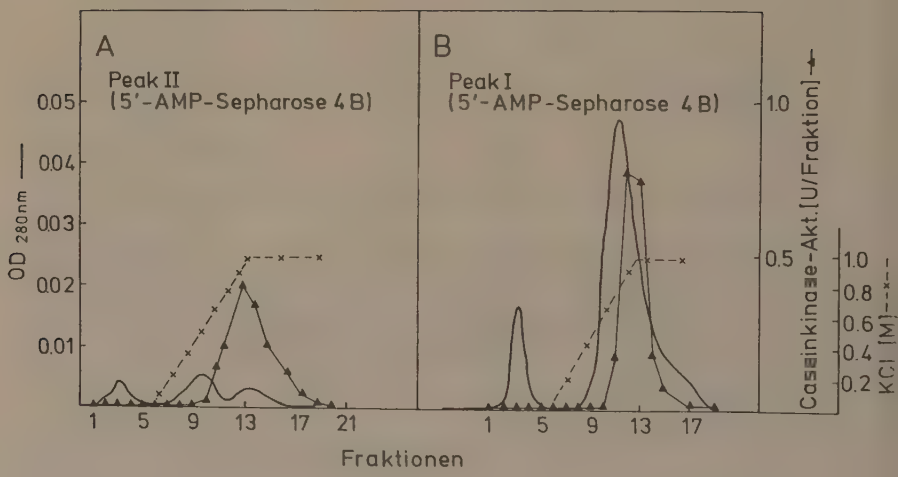

Abb. 13 A: Chromatographie von Peak II (5'-AMP-Sepharose 4B) an Casein-Sepharose 4B

B: Chromatographie von Peak I (5'-AMP-Sepharose 4B) an Casein Sepharose 4B

4.1.3 Chromatographie an Casein-Sepharose 4B

Beide Aktivitäts-Peaks der 5'-AMP-Sepharose 4B Säule konnten nach Dialyse gegen Puffer H an Casein-Sepharose 4B gebunden werden (Abb. 13, A und B) und wurden mit der gleichen Konzentration an KCl/Puffer H (0.9 M KCl) von der Säule eluiert. Eine Zusammenfassung der gesamten Reinigung ist in Tabelle 3 dargestellt.

4.1.4 SDS-Gelelektrophorese

Eine Gelelektrophorese in Gegenwart von 0.1% SDS ergab im Fall von Peak II der 5'-AMP-Sepharose 4B Säule nach anschließender Chromatographie an Casein-Sepharose 4B nur eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 57 K (Abb. 14, Spalte 5 und 6). Die gleiche Bande war unter vielen anderen vorhanden, wenn Peak I (5'-AMP-Sepharose 4B Säule) nach dem Casein-Sepharose 4B Schritt auf das Gel aufgetragen wurde (Abb. 14, Spalte 3 und 4).

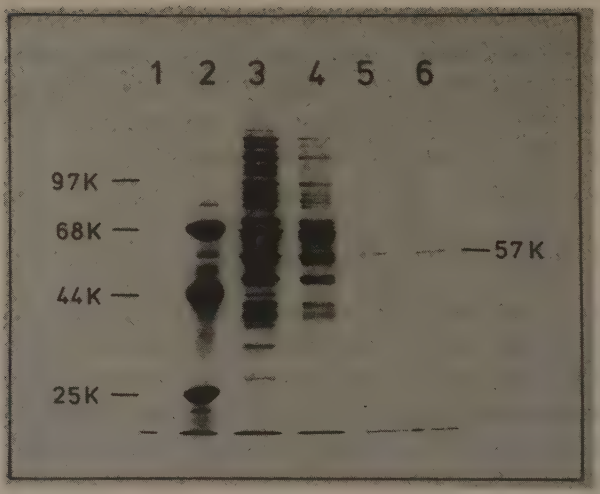

Abb. 14 SDS-Gelelektrophorese (10% Acrylamid) von Casein-Sepharose 4B Fraktionen

Spalte 1: 5 µg Phosphorylase b (97 K)

Spalte 2: je 10 µg BSA (68 K), Ovalbumin (44 K), Chymotrypsinogen (25 K)

Spalte 3: 100 µg Peak I (5'-AMP-Sepharose 4B) nach Casein-Sepharose 4B

Spalte 4: 50 µg wie in Spalte 3

Spalte 5: 5 µg Peak II (5'-AMP-Sepharose 4B) nach Casein-Sepharose 4B

Spalte 6: 10 µg wie in Spalte 5

Tab. 3

Reinigung der Caseinkinase A aus 200 ml 100 000xg Überstand

Enzym - fraktion	Gesamt-Akt. (U)	Protein (mg)	Spezif.Akt. (U/mg)	Reinigungs- faktor	Ausbeute [%]
P-11 Säule 0.6 NaCl Fraktion	38.6	97.6	0.38	1.0	100.0
HA-Ultrogel Säule	36.3	65.2	0.6	2.6	94.0
5'-AMP-Sepharose 4B Säule					
Peak I	5.4	9.8	0.55	-	14.0
Peak II	4.7	0.8	6.1	15.8	12.1
Casein-Sepharose 4B (Auftrag: Peak II)	3.6	0.1	36	94.7	9.3

4.2 Caseinkinase G

4.2.1 Reinigung des 1 M NaCl Peaks der P-11 Säule an Hydroxylapatit (HA-Ultrogel)

Vier in Puffer H/50% Glycerin bei -20°C aufbewahrte 1 M NaCl Peaks (V = 17.5 ml; Protein: 23.1 mg; Aktivität: 111.4 U; spez.Akt.: 4.8 U/mg) verschiedener Phosphocellulose P-11 Aufarbeitungen wurden vereinigt und zunächst an einer in Puffer G äquilibrierten Sephadex G-50 Säule von niedermolekularen Substanzen befreit. Die gesammelten Proteinfraktionen (Fr. 3-8, V = 70 ml) wurden auf eine HA-Ultrogel Säule (BV = 20 ml) mit einer Flußrate von 60 ml/h aufgetragen und Durchlauf und Nachwasch (V = 100 ml) gesammelt. Danach wurde die an die Säule gebundene Enzymaktivität mit einem linearen Gradienten (2 x 100 ml) von 20 mM - 500 mM Phosphat eluiert. Die Analyse der Proteinkinase-Aktivität der Säulenfraktionen mit Casein als Substrat zeigte, daß die Caseinkinase G in einem Peak bei einer Konzentration von 0.25 M Phosphat von der Säule eluierte (Abb. 15). Es wurden 0.7 mg Protein und eine Gesamtaktivität von 42 U wiedergefunden. Die spezifische Aktivität der partiell gereinigten Caseinkinase G betrug 60 U/mg. Dies entspricht einer 12-fachen Anreicherung gegenüber dem Ausgangsmaterial (1 M NaCl Peaks) mit einer Ausbeute von 47%. Die Fraktionen 10-14 (V = 47 ml) mit Caseinkinase G-Aktivität wurden zunächst für 5 h gegen 600 ml 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 2 mM EDTA, 1 mM DTE, 25% PEG auf ein Volumen von 6 ml konzentriert. Die weitere Konzentrierung auf ein Volumen von 2 ml erfolgte durch Dialyse gegen 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50% Glycerin. Die Enzymfraktion wurde bei -20°C aufbewahrt und als Enzymmaterial für die weiteren Versuche verwendet.

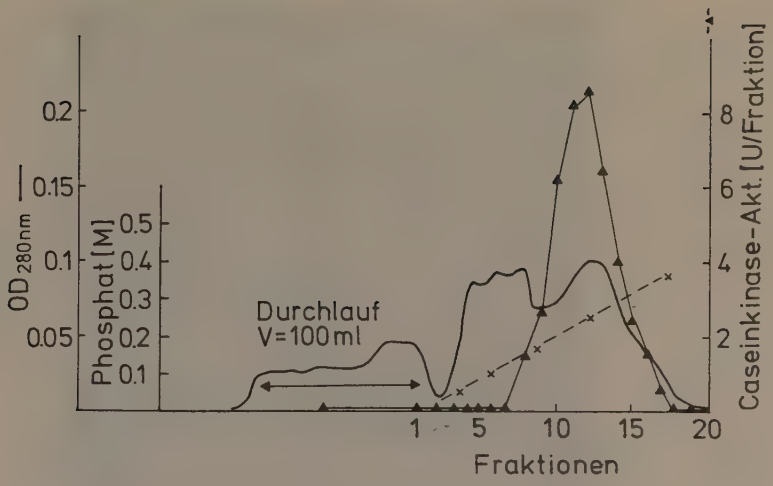

Abb. 15 Reinigung des 1 M NaCl Peaks der P-11 Säule an Hydroxylapatit (HA-Ultrogel)

Auftrag: 70 ml mit 23.1 mg Protein;Caseinkinase G-Aktivität: 111.4 U
Weitere Einzelheiten siehe Text

Die Effizienz der Reinigung ist in Abb. 16 deutlich zu sehen. In der SDS-Elektrophorese (10% Acrylamid) sind die Fraktionen 1 M NaCl Peak P-11 Säule (Abb. 16, Spalte 2) und Eluat der HA-Ultrogel Säule (Abb. 16, Spalte 3) gegenübergestellt. Nach der Reinigung an HA-Ultrogel wurden proteinspezifisch färbbare Banden vom Molekulargewicht 90 K, 87 K, 74 K, 34 K und 24 K (Abb. 16, Spalte 3) gefunden.

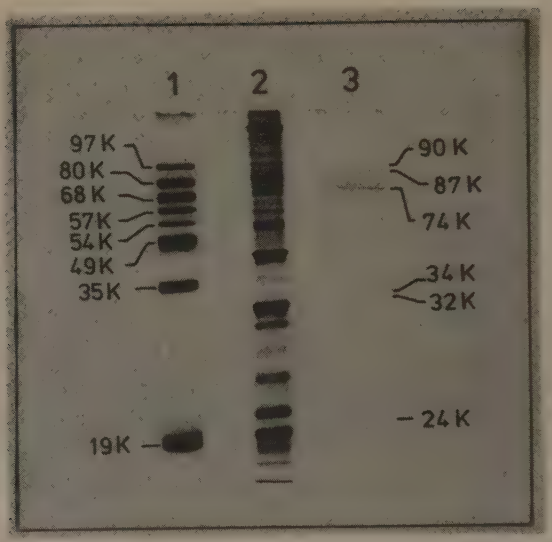

Abb. 16 SDS-Gelelektrophorese. Vergleich von 1 M NaCl Peak der P-11 Säule und HA-Ultrogel Eluat

Spalte 1: Eichproteine je 5 µg
Phos b (97 K), Transferrin (80 K), BSA (68 K), Pyruvatkinase (57 K), Glutamatdehydrogenase (54 K), Fumarase (49 K), LDH (35 K) und Calmodulin (19 K)

Spalte 2: 100 µg 1 M NaCl Peak P-11

Spalte 3: 20 µg HA-Ultrogel Eluat

4.2.2 Effekt von Spermin und Spermidin auf die Phosphorylierung von Casein

In Abb. 17 ist die Beeinflussung der Phosphorylierung von Casein durch die Caseinkinase G bei steigenden Konzentrationen an Polyaminen dargestellt. Eine Aktivierung ist erst im Konzentrationsbereich von 500 µM bis 1 mM zu sehen. Die maximale Aktivierung ist bei einer Konzentration von 2 mM Spermin erreicht (1.5-fache Aktivierung), wohingegen die Aktivierung in Gegenwart von Spermidin bis zu einer Konzentration von 10 mM kontinuierlich ansteigt (1.2-fache Aktivierung). Der Enzymtest wurde nach 2.3.4.4 durchgeführt.

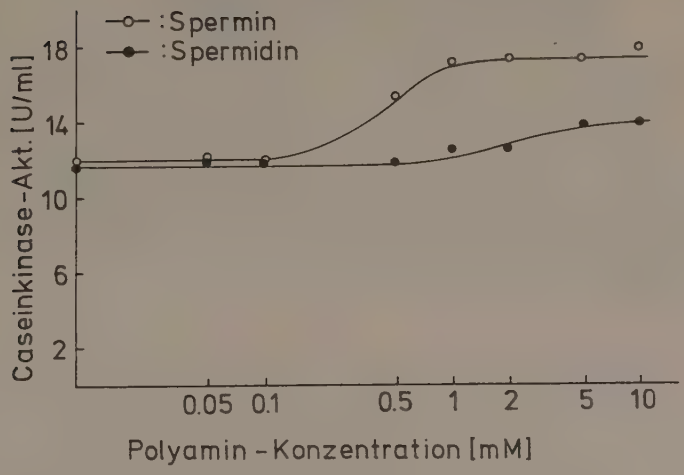

Abb. 17 Beeinflussung der Phosphorylierung von Casein durch Caseinkinase G bei steigenden Konzentrationen an Polyamin

4.2.3 Einfluß von Spermin und Spermidin auf die endogene Phosphorylierung der Caseinkinase G (HA-Ultrogel Fraktion)

Zur endogenen Phosphorylierung wurden 20 µl Enzym (8 µg Protein) in einem Gesamtvolumen von 200 µl in Phosphorylierungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM Mg^{2+}, 10 mM ME) mit 5 µl ATP*(12 µCi) in Abwesenheit oder Gegenwart von 5 mM Polyamin für 10 min bei 30°C inkubiert. Der Phosphateinbau wurde nach 2.3.4 durch eine Zeitkinetik bestimmt. Nach 10 min wurden je 70 µl aus den Reaktionsansätzen entnommen, mit jeweils 40 µl SDS-Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel 2 min bei 90°C denaturiert. Die Bestimmung der Molekulargewichte endogen radioaktiv markierter Proteinbanden erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese (10% Acrylamid) und anschließender Autoradiographie (Abb. 18). Von den phosphorylierten Banden mit einem Molekulargewicht von 89 K, 74 K, 54 K, 49 K, 38 K, 35 K, 26 K und 23 K wurden die mit (◀) markierten Banden (Abb. 18) in Gegenwart von Spermin oder Spermidin deutlich stärker phosphoryliert. Bei der 89 K-Bande ist ohne Polyamin so gut wie kein Phosphateinbau zu verzeichnen (Abb. 18, Spalte 1). Die phosphorylierten Banden vom Molekulargewicht 89 K, 74 K, 35 K und 23 K korrelieren mit den in Abb. 16, Spalte 3, proteinspezifisch angefärbten Banden.

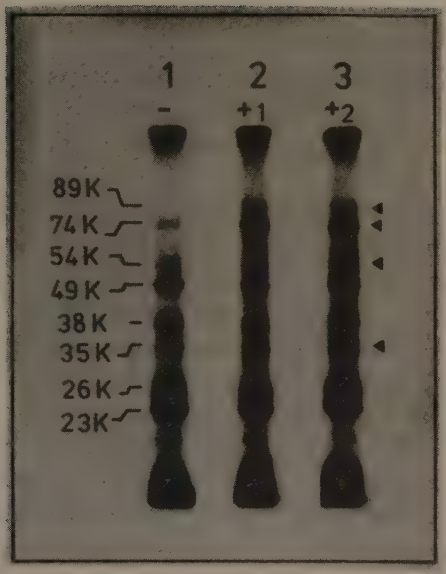

Abb. 18 Endogene Phosphorylierung von Caseinkinase G (HA-Ultrogel Fraktion)

Spalte 1: (-) 100 µl (2500 ipm) - Polyamin
Spalte 2: ($+_1$) 100 µl (2900 ipm) + 5 mM Spermin
Spalte 3: ($+_2$) 100 µl (2850 ipm) + 5 mM Spermidin

4.3 cAMP-unabhängige Proteinkinase

4.3.1 Zeitkinetik der Phosphorylierung von Histon Typ IIa bei zwei verschiedenen pH-Werten und niedriger und hoher Mg^{2+}-Ionen Konzentration im Testansatz

In Abb. 19 ist der Zeitverlauf der Histon-Phosphorylierung bei 10 mM Mg^{2+}, pH 6.5; 10 mM Mg^{2+}, pH 8.0 und 75 mM Mg^{2+}, pH 8.0 dargestellt. Allen drei Kurven ist gemeinsam, daß sie bis 10 bzw. 20 min linear verlaufen und dann durch eine Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit abflachen und nach etwa 30 min ein Plateau des Phosphateinbaus erreichen. Bei niedriger Mg^{2+}-Ionen Konzentration (10 mM Mg^{2+}) und einem pH-Wert von 8.0 ist nach 10 min bereits doppelt soviel Phosphat eingebaut, wie bei 10 mM Mg^{2+}, pH 6.5. Durch Erhöhung der Mg^{2+}-Ionen Konzentration auf 75 mM Mg^{2+} wurde bei einem pH-Wert von 8.0 bereits nach 10 min 6 mal soviel Phosphat eingebaut wie bei der Kurve mit 10 mM Mg^{2+}, pH 6.5. Eine 3-fache Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber der Kurve mit 10 mM Mg^{2+}, pH 8.0 konnte bei einem Zeitpunkt von 10 min beobachtet werden. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde der Test auf cAMP-unabhängige Proteinkinase routinemäßig bei 75 mM Mg^{2+}, pH 8.0 im Test durchgeführt und die Phosphorylierungsdauer bei der Messung von Säulenprofilen zur Erreichung reproduzierbarer Ergebnisse auf höchstens 10 min beschränkt.

4.3.2 Native Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration an Sepharose CL-6B

Eine mit Puffer B äquilibrierte Sepharose CL-6B Säule wurde durch Eichung mit Proteinen von bekanntem Molekulargewicht kalibriert. Als Eichproteine dienten dabei: Ferritin (Dimer: $9 \cdot 10^5$D, Monomer: $4.5 \cdot 10^5$D), Katalase ($2.4 \cdot 10^5$D). Aldolase ($1.47 \cdot 10^5$D) und Hämoglobin ($6.7 \cdot 10^4$D). Das Ausschlußvolumen (V_o) wurde mit Dextran-Blau 2000 bestimmt.

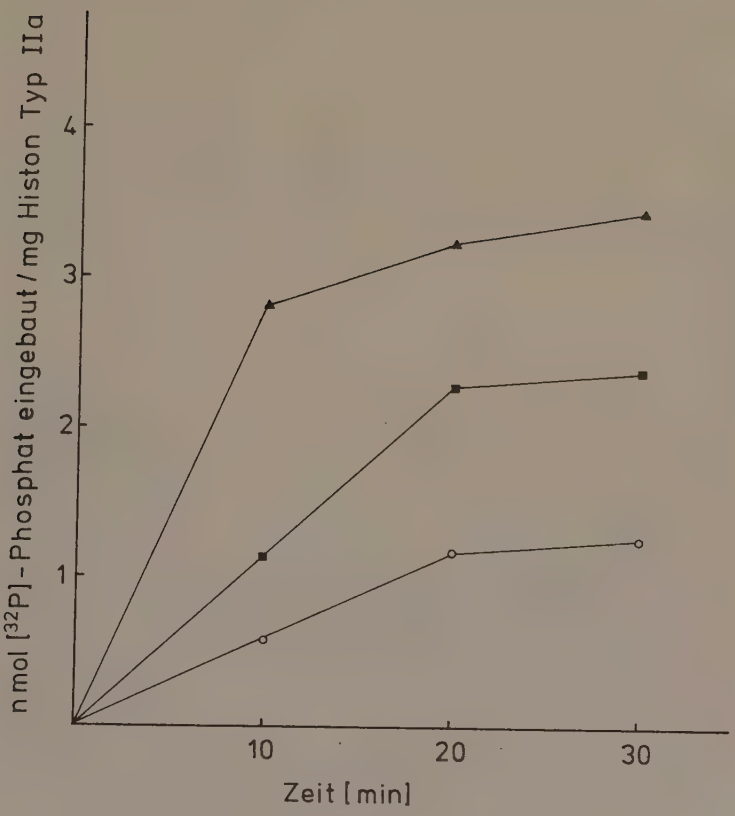

Abb: 19 Zeitverlauf der Phosphorylierung von Histon Typ IIa durch cAMP-unabhängige Proteinkinase

Der Reaktionsansatz enthielt: 2 mg/ml Histon Typ IIa in MOPS-Puffer;
o - o pH 6.5, 10 mM Mg^{2+}
● - ● pH 8.0, 10 mM Mg^{2+}
▲ - ▲ pH 8.0, 75 mM Mg^{2+}
Die Histonkinase-Aktivität wurde, wie in "Material und Methoden" beschrieben (2.3.4.3), bestimmt.

Die Gelfiltrationsläufe wurden unter Standardbedingungen wie in 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt. Als Enzymmaterial diente ein Teil vom konzentrierten Peak III (cAMP-unabhängige Proteinkinase), der nach 3.4 präpariert worden war. Die Enzymaktivität eluierte in einem Peak (Fr. 35 - 52) von der Säule (Abb. 20). Das Elutionsvolumen des Enzyms (V = 92.4 ml) entsprach einem Molekulargewicht von $2.4 \cdot 10^5$D. Die Anreicherung war 6-fach und die Ausbeute an Enzymaktivität nach dem Säulenverlauf (24 U) betrug 63% des Auftrags.

4.3.3 Chromatofocussierung an PBE 94

Die Chromatofocussierung wurde wie in "Material und Methoden" beschrieben (siehe 2.2.5.6) durchgeführt. Als Enzymfraktion diente ein Peak II (DE-52 Material, siehe 3.4), der in 50% Glycerin bei -20°C aufbewahrt worden war. Die Enzymaktivität eluierte in einem Peak (Fr. 26 - 32) bei einem pH-Wert von 5.5 von der Säule (Abb. 21). Dies deutet darauf hin, daß das Enzym einen isoelektrischen Punkt bei pH 5.5 besitzt und erklärt die Präzipitation zusammen mit der cGMP-abhängigen Proteinkinase bei der Säurefällung (siehe 3.5). Von den 9.7 U, die auf die Säule aufgetragen wurden, wurden 4.1 U nach der Chromatofocussierung wiedergefunden (Fr. 26 - 32, Abb. 21) und die Enzymaktivität war bei einer Ausbeute von 42% 12-fach angereichert worden.

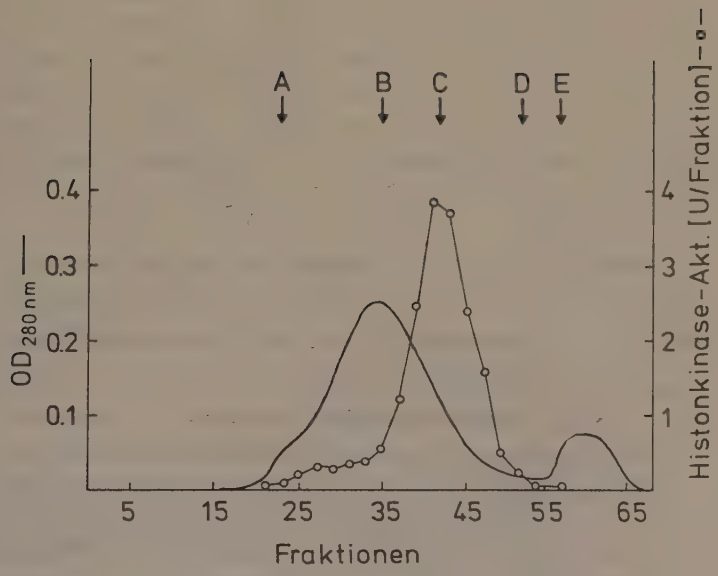

Abb. 20 Gelfiltration von cAMP-unabhängiger Proteinkinase an Sepharose CL-6B

Auftrag: 2 ml /75 mg Peak III (siehe 3.4)
Enzymaktivität: 48 U

Benutzt wurde eine Säule mit 1.6 cm Durchmesser und 80 cm Füllhöhe. Es wurden Fraktionen à 2.2 ml gesammelt.

Eichproteine: A = Ferritin-Dimer, B = Ferritin-Monomer, C = Katalase, D = Aldolase, E = Hämoglobin

Der Enzymtest wurde in 50 mM MOPS pH 8.0, 75 mM Mg^{2+} durchgeführt (siehe 2.3.4.3)

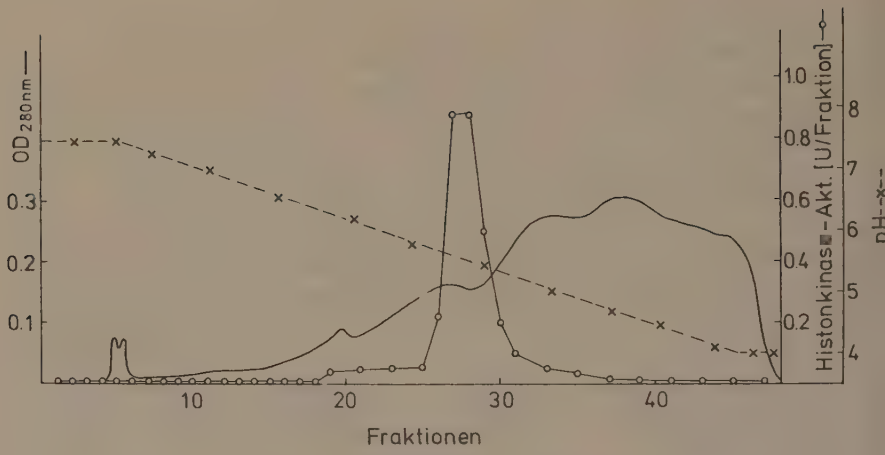

Abb. 21 Chromatofocussierung von cAMP-unabhängiger Proteinkinase an PBE 94

Auftrag: 1 ml (85 mg Protein)

Enzymaktivität: 9.7 U

Benutzt wurde eine Säule von 0.9 cm Durchmesser und einer Füllhöhe von 30 cm. Es wurden Fraktionen à 5 ml gesammelt.

Der Enzymtest wurde in 50 mM MOPS pH 8.0, 75 mM Mg^{2+} durchgeführt (siehe 2.3.4.3)

4.3.4 Einfluß von Calmodulin auf die Zeitkinetik der Phosphorylierung von Histon Typ IIa

Die Phosphorylierung von Histon Typ IIa in Abwesenheit oder Gegenwart von 100 µM Ca^{2+}, 2.5 µM Calmodulin ist in Abb. 22 dargestellt. Für den Test wurde eine über 5'-AMP-Sepharose 4B und anschließende Sephacryl S-300 Chromatographie gereinigte Enzymfraktion (Peak I - S-300, Abb. 2C) verwendet. Durch die Gegenwart von Ca^{2+} und Calmodulin wurde eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bewirkt, so daß bei einem Zeitpunkt von 20 min bereits doppelt soviel

Phosphat eingebaut war wie beim Kontrollversuch ohne Zusätze. Ca^{2+} allein bewirkte keine Erhöhung der Reaktionsrate (Ergebnis nicht gezeigt). Durch Zusatz von 100 µM TFP im Reaktionsansatz konnte die Erhöhung der Enzymaktivität durch Ca^{2+} und Calmodulin nicht unterdrückt werden, wie dies normalerweise bei spezifischen durch die Ca^{2+}-Bindungsfunktion des Calmodulin übermittelten Effekten der Fall ist. Alle drei Kurven zeigen ein Abknicken der Reaktionsgeschwindigkeit nach 20 min, wie dies schon bei den Phosphorylierungsansätzen in 4.3.1 beobachtet wurde.

4.3.5 Phosphorylierung von myosin light chains in Abwesenheit und Gegenwart von Calmodulin und Phosphorylase b

Abb. 23 zeigt die Phosphorylierung von myosin light chains und Phosphorylase b durch die cAMP-unabhängige Proteinkinase. Für die Inkubationsansätze wurde die gleiche Enzymfraktion verwendet wie in 4.3.4. Die Reaktionsrate war linear bis 30 min Inkubationszeit und zugesetztes Ca^{2+} und Calmodulin hatten keinen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Im Gegensatz dazu wurde Phosphorylase b nicht als Substrat akzeptiert.

4.3.6 Bindungsversuch der cAMP-unabhängigen Proteinkinase an Calmodulin-Sepharose 4B

Die 2 ml Calmodulin-Sepharose 4B wurden mit 4 Volumen 4 M Guanidinhydrochlorid vorgewaschen und in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 3 mM Mg $(CH_3COO)_2$, 1 mM DTE, 200 µ M Ca^{2+} äquilibriert. Der Auftrag (200 µl DE-52 Pool/50% Glycerin) wurde an einer in obigem Puffer äquilibrierten G-25 Säule entsalzt (V = 1 ml) und danach auf die Calmodulin-Sepharose 4B Säule aufgetragen. Die Säule wurde zunächst mit 1 M NaCl und dann zur spezifischen Elution mit 1 mM EGTA

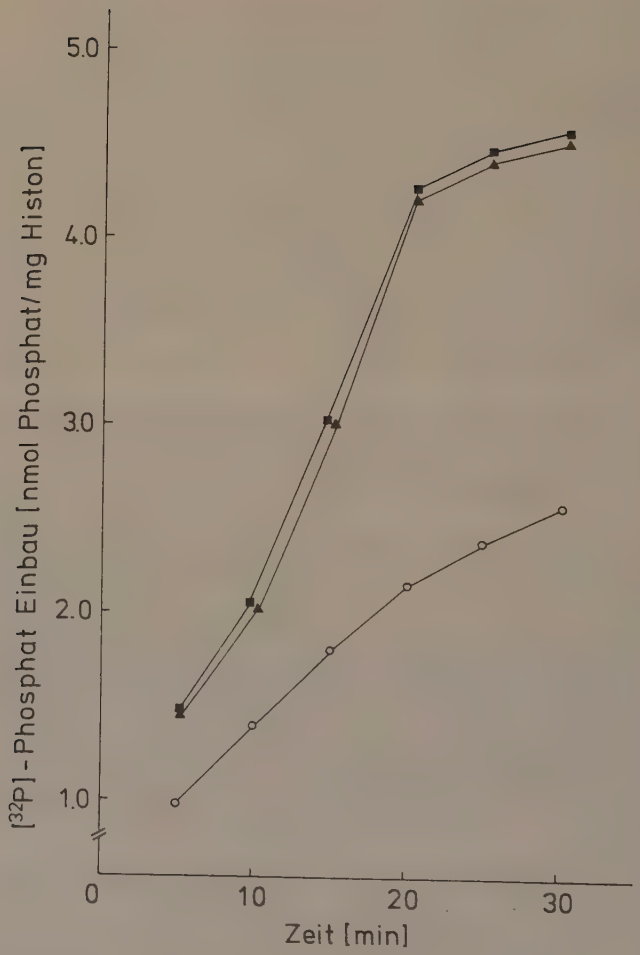

Abb. 22 Einfluß von Calmodulin auf den Zeitverlauf der Phosphorylierung von Histon Typ IIa

Der Reaktionsansatz enthielt: 2 mg/ml Histon Typ IIa in MOPS-Puffer pH 6.8, 10 mM Mg^{2+}; ohne Ca^{2+} und Calmodulin (- o -); mit 0.1 mM Ca^{2+} und 2.5 µM Calmodulin (- ▲ -); und mit 0.1 mM Ca^{2+}, 2.5 µM Calmodulin; 0.1 mM TFP (- ■ -). Die Histonkinase-Aktivität wurde,wie in "Material und Methoden" beschrieben (siehe 2.3.4.3),bestimmt.

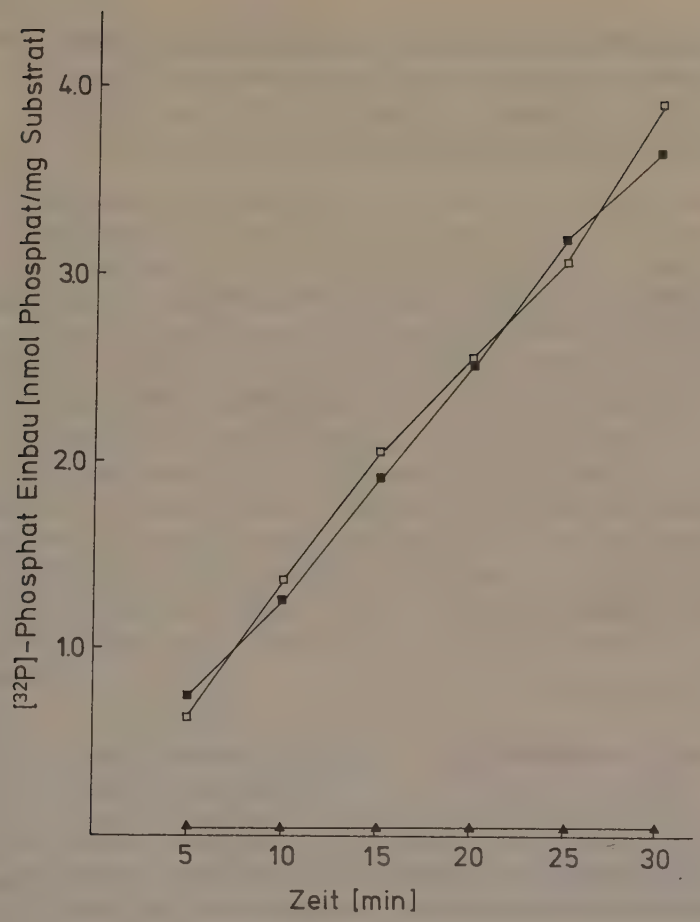

Abb. 23 Phosphorylierung von myosin light chains und Phosphorylase b durch cAMP-unabhängige Proteinkinase

Der Inkubationsansatz enthielt: 4 mg/ml myosin light chains in 20 mM Tris/HCl pH 7.4 ohne (- ■ -) und mit (- □ -) 0.1 mM Ca^{2+}, 2.5 µM Calmodulin oder 5 mg/ml Phosphorylase b (- ▲ -) in 50 mM MOPS pH 6.8. Die Aktivität der cAMP-unabhängigen Proteinkinase wurde,wie in "Material und Methoden" beschrieben (siehe 2.3.4.3), bestimmt.

eluiert. 86% der Aktivität befanden sich im Durchlauf und 4.5% der Aktivität war im 1 M NaCl Eluat erhalten (Tabelle 4). Im biospezifischen 1 mM EGTA-Eluat war keine Histonkinase-Aktivität nachzuweisen.

Tab. 4

Bindungstest von cAMP-unabhängiger Proteinkinase an Calmodulin-Sepharose 4B

Fraktion	Volumen (ml)	Aktivität (U)
Auftrag	0.9	2.2
Durchlauf Calmodulin-Sepharose 4B	4	1.9
1 M NaCl-Eluat	4	0.1
Biospez. 1 mM EGTA-Eluat	4	0

Der Histonkinase-Test wurde,wie in "Material und Methoden" beschrieben (siehe 2.3.4.3), durchgeführt.

4.3.7 Parallelität der Histonkinase- und myosin light chain Kinase Profile an zwei verschiedenen Säulen

4.3.7.1 Chromatographie an DEAE-Cellulose (DE-52)

Zwei kombinierte S-300 Peaks V = 9.5 ml (siehe 3.1.3, Abb. 2C) wurden gegen 1 l Puffer E dialysiert und anschließend auf eine DE-52 Säule (BV = 10 ml) aufgetragen. Nach dem Sammeln der Durchlauf-Fraktionen wurde die gebundene Enzymaktivität mit einem linearen Gradienten von 0 - 0.5 M NaCl in Puffer E von der Säule eluiert. Die Fraktionen wurden dann auf Enzymaktivität gegenüber Histon Typ IIa ohne und mit Ca^{2+} und Calmodulin im Test und auf light chain Kinase-Aktivität getestet. Die Histonkinase-Aktivität und myosin light chain Kinase-Aktivität eluierten deckungsgleich in einem Peak bei einer Ionenstärke von 0.22 M NaCl von der Säule (Abb. 24). Die Fraktionen mit Enzymaktivität (Fr. 25 - 31, V = 28 ml) wurden gegen Puffer E dialysiert und für den nächsten Chromatographieschritt an Histon-Sepharose 4B verwendet.

4.3.7.2 Chromatographie der DE-52 Enzymfraktion an Histon-Sepharose 4B

Die dialysierten Fraktionen (Fr. 25 - 31, V = 28 ml) wurden auf eine in Puffer E äquilibrierte Histon-Sepharose 4B Säule aufgetragen und die Enzymaktivität mit einem linearen Gradienten von 0 - 1 M NaCl in Puffer eluiert. Die Fraktionen wurden wie in 4.3.7.1 auf Histonkinase- und myosin light chain Kinase-Aktivität getestet. Beide Enzymaktivitäten eluierten wiederum deckungsgleich in einem Peak bei einer Ionenstärke von 0.15 M NaCl von der Säule (Fr. 19 - 25, Abb. 25). Die Parallelität der Elution beider Enzymaktivitäten an den zwei benutzten Säulen erhärtete die Vermutung, daß sowohl die Histonkinase-Aktivität als auch die myosin light chain Kinase-Aktivität zu einem Enzym gehören.

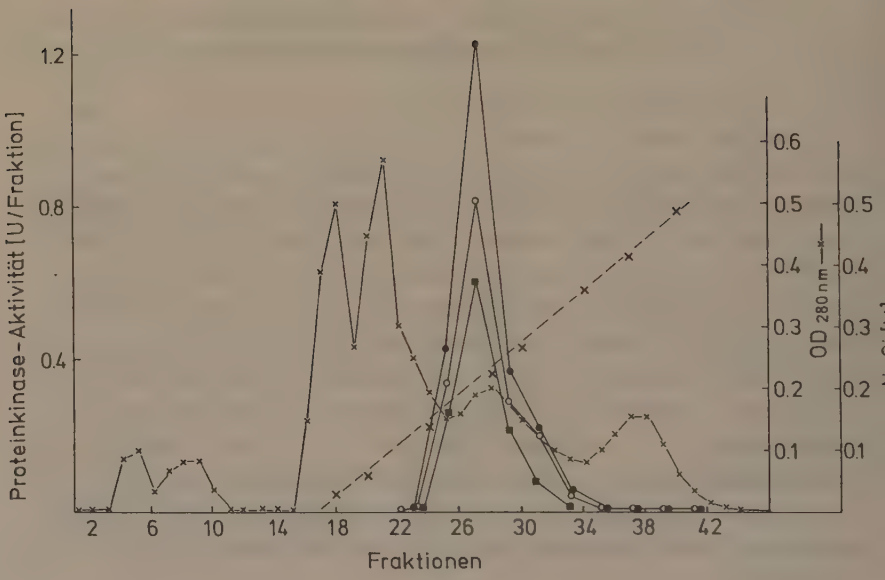

Abb. 24 Chromatographie von cAMP-unabhängiger Proteinkinase (Peak I S-300) an DE-52

Auftrag: 9.5 ml (21 mg Protein)
Säule: 10 ml Bettvolumen
Gradient: 2 x 50 ml 0 - 0.5 M NaCl in Puffer E

Die Proteinkinase-Aktivität wurde mit 2 mg/ml Histon Typ IIa in 50 mM MOPS pH 6.8, 10 mM Mg^{2+} ohne (- o -) und mit 100 µM Ca^{2+}, 2.5 µM Calmodulin (- ● -) oder mit 4 mg/ml myosin light chains (- ■ -), wie in "Material und Methoden" beschrieben, gemessen.

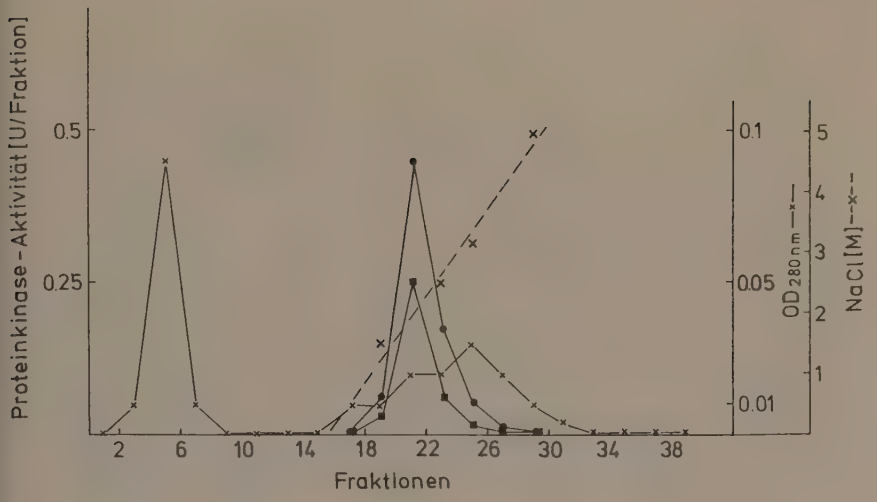

Abb. 25 Chromatographie der DE-52 Enzymfraktion an Histon-Sepharose 4B

Auftrag: Fr. 25 - 31 DE-52 V = 28 ml (3.1 mg Protein)
Säule: Bettvolumen V = 10 ml
Gradient: 2 x 50 ml von 0 - 1 M NaCl in Puffer E

Die Proteinkinase-Aktivität wurde mit 2 mg/ml Histon H IIa in 50 mM MOPS pH 6.8, 10 mM Mg^{2+} (- ● -) und mit 4 mg/ml myosin light chains (-■ -), wie in "Material und Methoden" beschrieben, bestimmt.

4.4 Katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase

4.4.1 Reinigung der katalytischen Untereinheit

Der erste Schritt in der Reinigung der katalytischen Untereinheit (Abb. 26A) basierte auf einer veränderten Methode von Beavo et al. [61], indem Phosphocellulose P-11 anstatt CM-Sephadex 50 und ein fester pH-Wert von 6.5 während aller Schritte verwendet wurde (siehe 2.2.7.1). Die Anreicherung war 1100-fach mit einer Ausbeute von 38%. Durch die Benutzung von STI-Sepharose 4B im zweiten Reinigungsschritt konnte das Enzym homogen gereinigt werden. 80% der aufgetragenen Enzymaktivität wurden an die Säule gebunden, wohingegen 20% der Aktivität in den Durchlauf-Fraktionen gefunden wurde (Abb. 26B). Dieser Schritt resultierte in einer weiteren 6-fachen Anreicherung und einer Enzympräparation mit einer spezifischen Aktivität von 250 U/mg (Substrat Histon Typ IIa), einer Ausbeute von 15% und einer über alle Schritte gemessenen Anreicherung von 6700-fach. Eine Zusammenfassung der Aufreinigung ist in Tabelle 5 wiedergegeben.

4.4.2 SDS-Gelelektrophorese

Das gereinigte Enzym ergab eine Proteinbande nach Elektrophorese des denaturierten Enzyms in Polyacrylamidgelen, die 0.1% SDS enthielten. Das Molekulargewicht der Bande betrug 39 000 D und in einigen Fällen konnte eine sehr schwache Bande (weniger als 2% an Protein vom Molekulargewicht um 20 000 D) beobachtet wurden (Abb. 27, Spalte 3 und 4).

Tab. 5

Reinigung der katalytischen Untereinheit aus Nebennierenrinde (400 ml 100 000xg Überstand). Die Proteinkinaseaktivität wurde in der Gegenwart von 200 µg Histon Typ IIa bestimmt

Fraktion	Protein (mg)	Gesamt-aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute %	Reinigungs-faktor -fach
100 000xg Überstand	10 900	402*	0.037	100	-
Phosphocellulose P-11	3.45	152	44.05	38	1190
STI-Sepharose 4B	0.24	60	250	15	6753

* Die Aktivität der katalytischen Untereinheit im 100 000xg Überstand wurde aus der Differenz der gemessenen Units + cAMP (10 µM)/-cAMP im Testansatz berechnet.

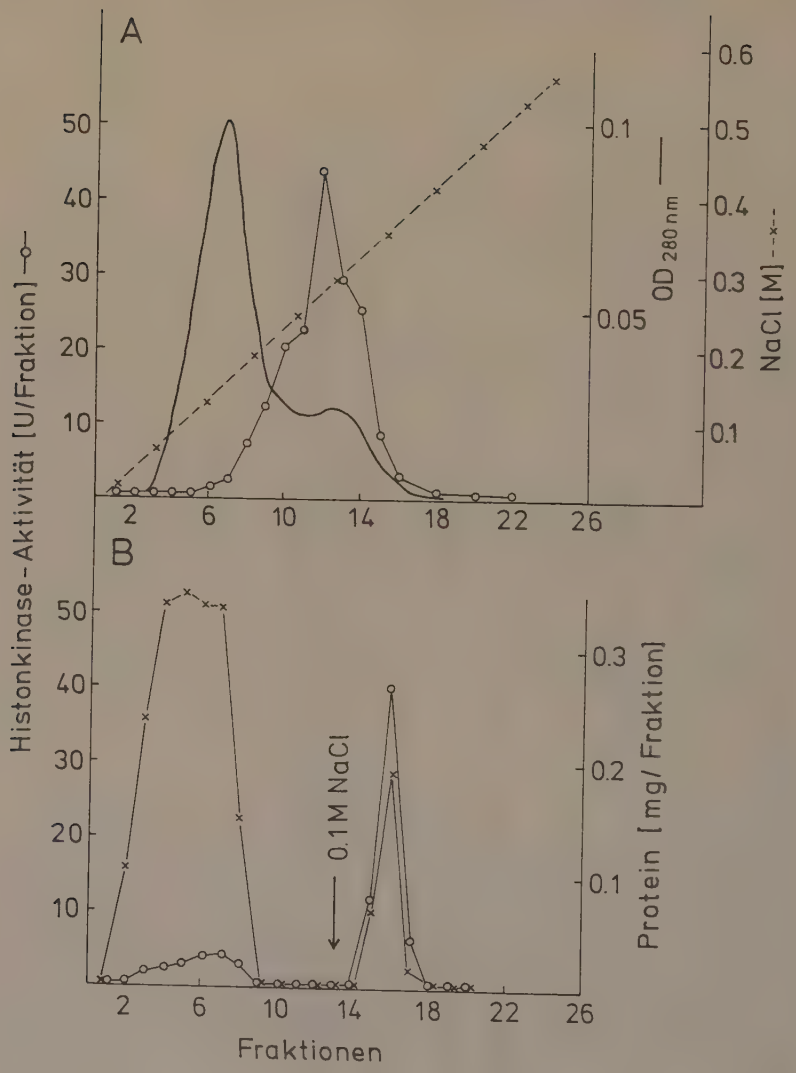

Abb. 26 Elutionsprofile der katalytischen Untereinheit von Phosphocellulose P-11 und STI-Sepharose 4B

Legende zu Abb. 26

A. Nach der Bindung der katalytischen Untereinheit an 20 ml P-11 im letzten Schritt (siehe 2.2.7.1) wurde das Säulenmaterial in eine Säule gegossen und die katalytische Untereinheit mit einem Salzgradienten (50 mM - 600 mM NaCl) in Puffer D eluiert. Es wurden Fraktionen à 10 ml gesammelt und sowohl deren Leitfähigkeit als auch deren Histonkinase-Aktivität mit Histon Typ IIa als Substrat (200 µg) gemessen. Die Fraktionen 9 - 15 wurden gesammelt und intensiv gegen Puffer E dialysiert.

B. Die dialysierte Fraktion (V = 50 ml) wurde auf eine STI-Sepharose 4B Säule (BV = 10 ml) aufgetragen und die katalytische Untereinheit mit 0.1 M NaCl in Puffer E eluiert. Es wurden Fraktionen à 6 ml gesammelt, und die Histonkinase-Aktivität wie in 2.3.4.1 beschrieben, bestimmt.

Abb. 27 SDS-Elektrophorese (10% Acrylamid) verschiedener Aufreinigungsstufen

Spalte 1: 40 µg Phosphocellulose P-11 Eluat
Spalte 2: 25 µg STI-Sepharose 4B Durchlauf
Spalte 3: 10 µg gereinigte kat. Untereinheit
Spalte 4: 5 µg gereinigte kat. Untereinheit

Die benutzten Eichproteine sind durch Pfeile markiert:
(a) Phos b (97 K); (b) BSA (68 K); (c) Pyruvatkinase (57 K); (d) Glutamatdehydrogenase (53 K); (e) Ovalbumin (43 K); (f) Lactat-dehydrogenase (35 K)

4.5 cGMP-abhängige Proteinkinase

4.5.1 Reinigung der cGMP-abhängigen Proteinkinase durch Affinitätschromatographie an cAMP-Agarose

Im Falle der cGMP-abhängigen Proteinkinase war die direkte Bindung des Enzyms aus 100 Ü Homogenisationspuffer B an die Affinitätsmatrix die Methode der Wahl. Zum 100 000xg Überstand wurde 4 mM Theophyllin zugesetzt, um die Aktivität der Phosphodiesterase zu inhibieren und die Umwandlung der an die Matrix gekoppelten cAMP-Gruppierungen zu 5'-AMP Resten zu verhindern. Von 3.75 g Protein ausgehend, konnten 200 µg an homogenem Enzym durch biospezifische Elution mit 0.1 mM cGMP erhalten werden. Die spezifische Aktivität betrug 65 U/mg (Substrat Histon H1) und die auf das Protein bezogene Aufreinigung war ~ 10 000-fach.

4.5.2 SDS-Gelelektrophorese

Die gereinigte cGMP-abhängige Proteinkinase erschien homogen in der SDS-Gelelektrophorese mit einem Molekulargewicht von 76 000 D (Abb. 28, Spalte A). Zum Vergleich ist in Abb. 28, Spalte B, eine cGMP-abhängige Proteinkinase Präparation aufgetragen, die in Gegenwart von Proteaseinhibitoren durch pH 5.5-Fällung, DE-52 Chromatographie und Affinitätschromatographie an cAMP-Agarose gereinigt worden war. Zwei Banden mit einem Molekulargewicht von jeweils 76 000 D und 68 000 D wurden erhalten. In der Literatur ist beschrieben worden, daß es sich bei der 68 000 D Bande um ein Proteolyseprodukt der 76 000 D Untereinheit der cGMP-abhängigen Proteinkinase handelt [62].

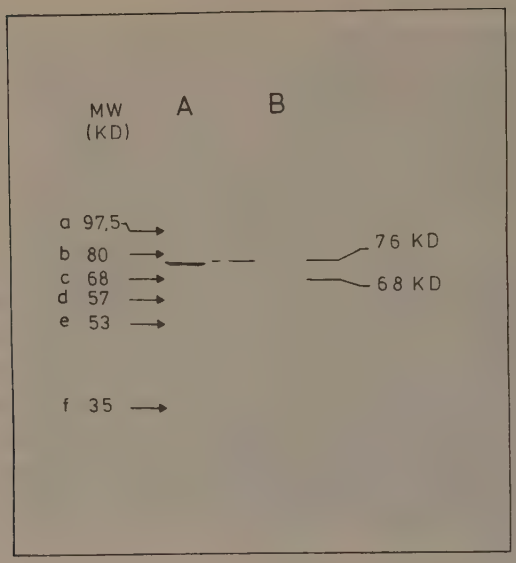

Abb. 28 SDS-Gelelektrophorese der cGMP-abhängigen Proteinkinase (10% Acrylamid)

Spalte A: 10 µg cGMP-abhängige Proteinkinase gereinigt in einem Schritt durch Affinitätschromatographie aus 100 Ü

Spalte B: 5 µg cGMP-abhängige Proteinkinase gereinigt durch pH 5.5 Fällung, DE-52 Chromatographie und Affinitätschromatographie

Die Positionen der verwendeten Eichproteine sind durch Pfeile markiert:
(a) Phos b, 97.5 KD; (b) Transferrin, 80 KD;
(c) BSA, 68 KD; (d) Pyruvatkinase, 57 KD;
(e) Glutamatdehydrogenase, 53 KD; (f) Lactatdehydrogenase, 35 KD.

4.5.3 Effekt von Calmodulin auf die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase in Gegenwart verschiedener Histonsubstrate

Tabelle 6 zeigt die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase durch 5 µM cGMP in der Gegenwart oder Abwesenheit von 100 µg Calmodulin mit verschiedenen Histonfraktionen als Phosphatakzeptoren. Lysin-reiches Histon (Histon H1) und leicht lysin-reiches Histon (Histon H2b) ergaben ohne Calmodulin im Test eine 3 - 4-fache Stimulierung durch 5 µM cGMP. Wenn eine gemischte Histonfraktion (Histon Typ IIa) die Arginin-reiche Spezies enthält, verwendet wurde, wurde nur eine 1.7-fache Stimulierung durch 5 µM cGMP beobachtet. Wenn Calmodulin in einem molaren Verhältnis zu den Histonsubstraten von 1:1 im Test zugegen war, wurden folgende Effekte beobachtet:

(1) Die Reihenfolge der Effektivität der verschiedenen Histonsubstrate als Phosphatakzeptoren wurde durch Calmodulin nicht beeinflußt.

(2) Die ohne cGMP im Test gemessene Basalaktivität wurde 2 - 5-fach erniedrigt.

(3) Die in Gegenwart von 5 µM cGMP gemessene Gesamtaktivität wurde für alle Histonfraktionen 2-fach erhöht.

(4) Die Aktivierung durch 5 µM cGMP in der Gegenwart von Calmodulin betrug ungefähr 17-fach für alle getesteten Histonfraktionen.

Tab. 6

Effekt von Calmodulin auf die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase in Gegenwart verschiedener Histonsubstrate. 0.8 µg cGMP-abhängige Proteinkinase* wurde verwendet. Die Menge an Histon pro Test betrug 200 µg und wo erforderlich, wurden 5 µM cGMP und/oder 100 µg Calmodulin dem Test zugesetzt.

Substrate	1	2	3	4	Aktivierung	
	- cGMP	+ cGMP	- cGMP + Calmodulin	+ cGMP + Calmodulin	2/1	4/3
	U/mg	U/mg	U/mg	U/mg	-	-
Histon Typ IIa	7.06	12.1	1.4	24.9	1.7	17.8
Histon H 1	16.8	63.2	6.5	108.0	3.8	16.6
Histon H2b	7.1	32.8	4.9	81.5	4.6	16.7

* Die cGMP-abhängige Proteinkinase wurde vor dem Test wie in 2.2.7.2.2 beschrieben von endogenem cGMP befreit.

4.6 Vergleich der Substratspezifitäten der drei isolierten Histonkinasen

Die Möglichkeit der drei isolierten Histonkinasen,verschiedene Phosphatakzeptoren zu phosphorylieren, ist in Tabelle 7 dargestellt. Die relative Effektivität der drei Proteinkinasen war wie folgt:

Katalytische Untereinheit:
Histon H2b > Histon Typ IIa > Histon H1

cGMP-abhängige Proteinkinase:
Histon H1 > Histon H2b > Histon Typ IIa

cAMP-unabhängige Proteinkinase:
Histon Typ IIa > Histon H2b > Protamin > Histon H1

Durch die katalytische Untereinheit und die cGMP-abhängige Proteinkinase konnte kein signifikanter Phosphateinbau oberhalb der Autophosphorylierung in das Substrat Protamin festgestellt werden.

Tab. 7

Vergleich der Substratspezifitäten der drei Histonkinasen in Gegenwart exogener Phosphatakzeptoren

Die Tests wurden wie in 2.3.4 beschrieben durchgeführt. Die Tests enthielten den jeweiligen Phosphatakzeptor in einer Konzentration von 200 µg/Test,und 5 µM cGMP wurde den Tests auf cGMP-abhängige Proteinkinase zugesetzt.

Phosphat-akzeptor	katal. Untereinh.	cGMP-Kinase	cAMP-unabh. Histonkinase*
	(U/mg)	(U/mg)	(U/mg)
Histon Typ IIa	272	10.7	1.2
Histon H1	218	55.1	0.5
Histon H2b	424	31.4	1.1
Protamin	-	-	0.7

* Es wurde eine Enzymfraktion verwendet, die nach DE-52 Chromatographie (siehe 3.4 Peak III) über Histon-Sepharose 4B und Sepharose CL-6B weitergereinigt worden war.

4.7 Phosphorylierung einer partiell gereinigten Cholesterinester-Hydrolase aus der Nebennierenrinde durch die drei Histonkinasen

Die partiell gereinigte Cholesterinester-Hydrolase (CEH) (isoliert von Dipl.-Chem. Günter Eiteljörge) wurde zunächst gegen Phosphorylierungspuffer (40 mM MOPS pH 7.0, 20% Glyzerin, 10 mM Mg^{2+}, 2 mM DTE, 0.5 mM Benzamidin) dialysiert. Je Phosphorylierungsansatz wurden 450 µl CEH-Fraktion verwendet und die Ansätze nach Zugabe der jeweiligen Proteinkinase (kat. Untereinheit: 20 µl (0.2 U); cGMP-abhängige Proteinkinase: 20 µl (0.36 U); cAMP-unabhängige Proteinkinase: 20 µl (0.06 U)) und Zugabe von 15 µl γ-[^{32}P]ATP (12.6 µCi) mit Puffer auf ein Volumen von 500 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Zusätzlich wurde die endogene Phosphorylierung der CEH-Fraktion ohne Zugabe von exogenen Proteinkinasen gemessen und die Autophosphorylierung der verwendeten Proteinkinasen ohne Enzym bestimmt. Die Phosphorylierung wurde für 30 min bei 30°C durchgeführt und eine Zeitkinetik der Phosphorylierung aufgenommen (Abb. 28). Bereits dort ist zu sehen, daß in der partiell gereinigten CEH-Fraktion eine endogene Phosphorylierung stattfindet, die durch eine in der Aufreinigung nicht abgetrennte Proteinkinase hervorgerufen wird (Abb. 29A). Ein über die endogene Phosphorylierung hinausgehender Phosphateinbau konnte nur durch den Zusatz von katalytischer Untereinheit bewirkt werden (Abb. 29B). Durch den Zusatz von cGMP-abhängiger Proteinkinase (Abb. 29C) und cAMP-unabhängiger Proteinkinase (Abb.29D) war der Phosphateinbau gegenüber der endogenen Phosphorylierung (Abb. 29A) sogar erniedrigt. Nach 30 min wurden Proben von je 50 µl gezogen und sofort mit 50 µl SDS-Probenpuffer vermischt und denaturiert. Danach wurden die Proben auf ein SDS-Gradientengel (7.5% - 12% Acrylamid) aufgetragen, das Gel nach der Elektrophorese getrocknet und eine Autoradiographie zur Identifizierung der phosphorylierten Proteinbanden durchgeführt (Abb.30).

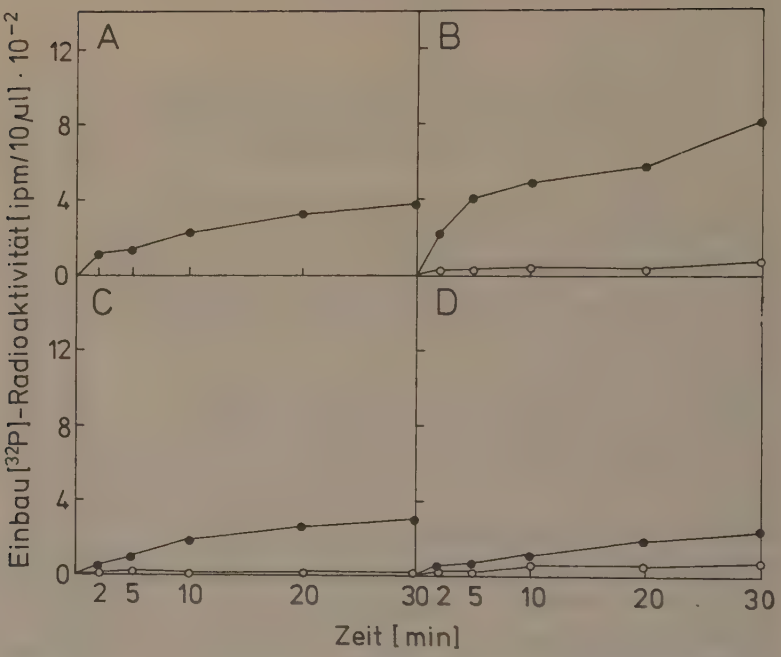

Abb. 29 Zeitkinetik der Phosphorylierung einer partiell gereinigten CEH-Fraktion durch die drei isolierten Histonkinasen

Es wurde der [^{32}P]-Phosphateinbau sowohl in die CEH-Fraktion (- ● -) als auch die Autophosphorylierung der jeweiligen Proteinkinase (- o -) bestimmt. Je Zeitpunkt wurde eine 10 µl Probe auf Plättchen gezogen.

A: CEH-Fraktion endogen; B: CEH-Fraktion + kat.Untereinheit; C: CEH-Fraktion + cGMP-abhängige Proteinkinase; D: CEH-Fraktion + cAMP-unabhängige Proteinkinase

Als interne Molekulargewichtstandards wurde die autophosphorylierte 39 K-Untereinheit der katalytischen Untereinheit (Abb. 30, B1) und die 76 K-Untereinheit sowie das 150 K-Dimer der cGMP-abhängigen Proteinkinase, die beide autophosphoryliert waren (Abb. 30, C1), verwendet. Die 86 K Bande (Untereinheit der CEH) ist bereits endogen phosphoryliert (Abb. 30A). Sie wird jedoch in Gegenwart von katalytischer Untereinheit deutlich stärker phosphoryliert (Abb. 30, B2). Durch Zusatz von cGMP-abhängiger Proteinkinase (Abb. 30, C2) und cAMP-abhängiger Proteinkinase (Abb. 30D) ist kein stärkerer Phosphateinbau zu verzeichnen, als ohnehin schon durch die endogene Phosphorylierung bewirkt wurde. Die Durchführung der Phosphorylierung mit cGMP-abhängiger Proteinkinase in Gegenwart von 75 mM Mg^{2+} (Abb. 30,C3) ergab eine Unterdrückung der Phosphorylierung der meisten Proteinbanden, einschließlich der 86 K Bande. Nur eine Bande im 150 K Bereich war deutlich stärker phosphoryliert als im Vergleich mit 10 mM Mg^{2+} im Test (Abb. 30,C2).

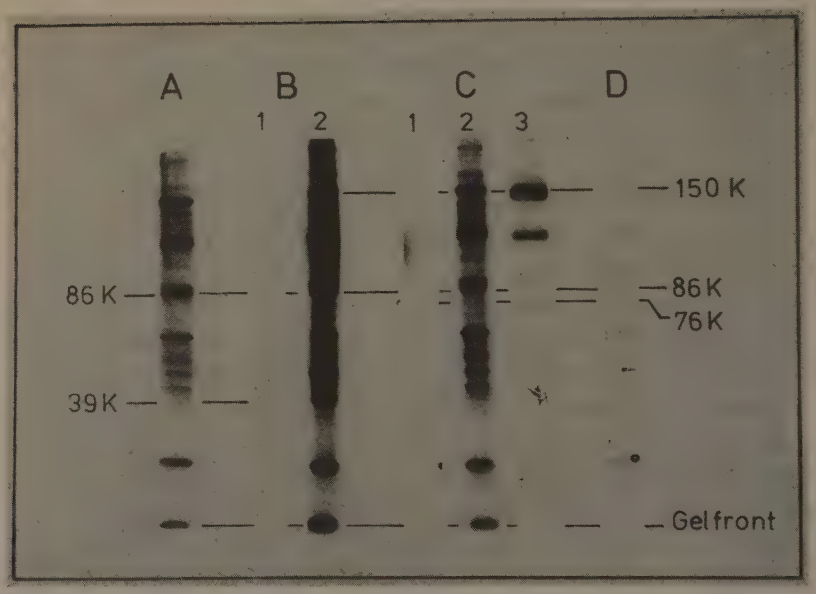

Abb. 30 Autoradiographie der mit verschiedenen Proteinkinasen phosphorylierten CEH-Fraktion

A: CEH-Fraktion endogen (1900 ipm); B1: Autophosphorylierung kat. Untereinheit (200 ipm); B2: CEH-Fraktion + kat. Untereinheit (4000 ipm); C1: cGMP-abh. Proteinkinase Autophosph. (120 ipm); C2: CEH-Fraktion + cGMP-abh. Proteinkinase (1500 ipm); C3: CEH-Fraktion + cGMP-abh. Proteinkinase, 75 mM Mg^{2+} im Ansatz (900 ipm); D: CEH-Fraktion + cAMP-unabh. Proteinkinase (900 ipm)

5. Diskussion

Trennung und Identifizierung verschiedener Proteinkinase-Aktivitäten

Die Messung der Aktivitäten der in dieser Arbeit nachgewiesenen und voneinander getrennten Proteinkinasen wurde mit den Modellsubstraten Histon und Casein vorgenommen. Aus praktischen Gründen wurde ein Histongemisch (Histon Typ IIa) und Casein verwendet, da die meisten Proteinkinase-Klassen mit diesen Substraten meßbar und voneinander unterscheidbar sind. Außerdem sind bisher die meisten endogenen Substrate der Proteinkinasen unbekannt oder bisher nicht in reiner Form isoliert worden.

Eine Trennung der mit Histon und Casein meßbaren Proteinkinasen wurde durch die bereits für andere Gewebe beschriebene P-11 Chromatographie erreicht [63-65]. Im Durchlauf der P-11 Säule befanden sich 90 - 95% der meßbaren Histonkinase-Aktivität und die Caseinkinasen (Caseinkinase A und G) wurden in Gegenwart von 0.1 M NaCl quantitativ an die P-11 Säule gebunden. Die außer der Caseinkinase A und G an die P-11 Säule bindende Histonkinase-Aktivität (5 - 10%) wurde weiter untersucht, da vermutet wurde,daß auf Grund der schwachen cAMP-Aktivierung eine cAMP-unabhängige Aktivität in den drei Peaks enthalten war (siehe 3.2.2). Durch die native Gelelektrophorese und die Photoaffinitätsmarkierung mit 8-N_3-[^{32}]cAMP konnte jedoch gezeigt werden, daß es sich um die gleichen cAMP-bindenden Aktivitäten handelte, die sowohl im P-11 Durchlauf als auch im 100 Ü des Rindes vorhanden waren. Die Gelfiltration dieser Aktivitäten an Sepharose 6B und Sepharose 4B (Ergebnisse nicht gezeigt) ergab jeweils cAMP-abhängige Proteinkinasen im Ausschlußvolumen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß ein Teil der cAMP-abhängigen Proteinkinase an eine hochmolekulare Struktur gebunden ist, die z.B. eine membrangebundene Proteinkinase-Aktivität,

einen Komplex mit endogenen Substraten, oder ein hochmolekulares Aggregat sein könnte. Die Trennung der Histon und Casein-Aktivitäten an P-11 war reproduzierbar, aber es gab eine quantitativ starke Variation der Caseinkinase A-Aktivität. Die Ergebnisse der Säulenläufe in Gegenwart von Proteaseinhibitoren und Detergenz (siehe 3.2.3) und der Einfluß von Proteaseinhibitoren auf die Aktivität der Caseinkinase A (siehe 3.2.4) legen nahe, daß die Variation der spezifischen Aktivität der Caseinkinase A bei verschiedenen P-11 Chromatographien durch Proteolyse bedingt sind, und daß es einen "Precursor" gibt, aus dem die Caseinkinase A-Aktivität entsteht. Die durch Cochet et al. [66] gefundene höhere spezifische Aktivität der Caseinkinase A nach $(NH_4)_2SO_4$-Fällung und langer Dialyse deuten ebenfalls auf eine Erhöhung der Enzymaktivität gegenüber dem Substrat Casein durch Proteolyse hin, da allein durch Stehenlassen der P-11 Enzymfraktionen im Kühlraum nach einem Tag bereits eine doppelt so hohe Enzymaktivität gemessen wurde. Die im P-11 Durchlauf enthaltene Histonkinase-Aktivität konnte erfolgreich durch DE-52 Chromatographie in Gegenwart von cAMP aufgetrennt werden (siehe 3.4), und es konnte außer der cAMP-abhängigen Proteinkinase eine cAMP-unabhängige Proteinkinase nachgewiesen werden. Durch pH 5.5 Fällung von 100 Ü (siehe 3.5) konnte zusätzlich eine cGMP-abhängige Proteinkinase identifiziert werden. Obwohl die Reinigung der verschiedenen Proteinkinasen aus einem gemeinsamen Trennungsgang sich anbot, wurden bis auf die Caseinkinase A, Caseinkinase G und cAMP-unabhängige Proteinkinase aus Gründen der Proteolyseempfindlichkeit die cGMP-abhängige Proteinkinase und die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase auf direktem Wege aus 100 Ü in Gegenwart von Proteasehemmern (Homogenisationspuffer B) isoliert.

Caseinkinase A

Der essentielle Schritt in der Reinigung der Caseinkinase A war die Chromatographie an 5'-AMP-Sepharose 4B (siehe 4.1.2). Da es sich eher um eine hydrophobe Chromatographie als eine spezifische Affinitätschromatographie handelte, konnte durch Bindungsversuche an CH-Sepharose 4B und AH-Sepharose 4B bestätigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Nur bei Verwendung einer 5'-AMP-Sepharose 4B Säule mit einer Länge von mehr als 15 cm wurde der zweite Peak mit der hohen spezifischen Aktivität erhalten. Dieses Resultat in Verbindung mit der Gelchromatographie an Sephacryl S-300 (siehe 3.1.1) ist ein Hinweis darauf, daß die Caseinkinase A in verschiedenen Aggregationszuständen existiert, die durch hohes Salz dissoziiert werden können [66,67]. Die SDS-Elektrophorese ergab eine Bande vom MG 57 000 D, wohingegen die aus anderen Geweben isolierten Aktivitäten ein MG von 37 000 D aufweisen [65,68]. Im Zusammenhang mit der vorher erwähnten Proteolyse sind die Ergebnisse von Cohen et al. [69] von Interesse, die aus Kaninchenskelettmuskel 3 Glykogen-Synthetaseaktivitäten auftrennen konnten, deren Substratspezifität gegenüber Casein durch Proteolyse zunahm. Die dort beschriebene 57 000 D Untereinheit der Glykogen-Synthetasekinase 3 könnte mit der hier isolierten 57 K-Untereinheit identisch sein. Die Caseinkinase A konnte nach den Kriterien der SDS-Elektrophorese homogen gereinigt werden mit einer spezifischen Aktivität von 36 U/mg.

Caseinkinase G

Die Stimulierung der partiell gereinigten Caseinkinase G (siehe 4.2) durch Polyamine, die als physiologische Aktivatoren diskutiert werden [66-70], ist von besonderem Interesse, da andererseits Heparin [71] und andere Glykosaminoglykane [71] als Inhibitoren der Enzymaktivität beschrieben wurden. Außerdem konnte ein Glykoprotein vom MG = 16 500 D als spezifischer Inhibitor der Casein G

aus der Nebennierenrinde des Rindes isoliert werden [72]. Für das aus Rattenleber [73] und Kaninchenreticulozyten [65] isolierte Enzym wurde eine $\alpha\alpha'\beta_2$-Struktur (α = 42 000 D, α' = 38 000 D, β = 26 000 D) vorgeschlagen. Das aus Rinderlunge gereinigte Enzym [74] enthält nur eine α-Untereinheit (37 000 D) und eine β-Untereinheit (26 000 D), die mit der autophosphorylierten Bande von 26 000 D in 4.2.3 übereinstimmt. Es gibt Hinweise darauf, daß die Caseinkinase G mit der als N II-Kinase bezeichneten Enzymaktivität aus Zellkernen [73] und mit der Glykogen-Synthetasekinase 5 identisch ist. Zusätzlich wurde in neuerer Zeit die Caseinkinase G als Untereinheit der RNA-Polymerase I beschrieben [75]. Die Caseinkinase G konnte aus der Nebennierenrinde partiell mit einer spezifischen Aktivität von 60 U/mg gereinigt werden.

cAMP-unabhängige Proteinkinase

Bereits in den ersten Untersuchungen (siehe 3.1 bis 3.2) konnte eine bisher nicht beschriebene, nach den Kriterien von Traugh et al. [76] cAMP-unabhängige Proteinkinase nachgewiesen werden. Diese Proteinkinase-Aktivität konnte auch nach DE-52 Chromatographie des P-11 Durchlaufs (siehe 3.4) und durch pH 5.5 Fällung des 100 Ü (siehe 3.5) gefunden werden. Die durch das native Molekulargewicht von 240 000 D (siehe 4.3.2) und den isoelektrischen Punkt pI ~ 5.5 (siehe 4.3.3) weiter charakterisierte cAMP-unabhängige Proteinkinase zeigte eine bessere Phosphorylierung von Histon Typ IIa bei einem pH-Wert von 8.0 und 75 mM Mg^{2+} (siehe 4.3.1). Diese Eigenschaft wurde für das proteolytische Fragment der Ca^{2+}-Phospholipid-abhängigen Proteinkinase beschrieben [77]. Das native Molekulargewicht von 250 000 D schließt jedoch aus, daß es sich bei diesem Enzym um die Ca^{2+}-Phospholipid-abhängige Proteinkinase oder deren proteolytisches Produkt handeln könnte [77,78]. Die Versuche der Phosphorylierung von Histon

Typ IIa und myosin light chains (siehe 4.3.2 und 4.3.5) mit und ohne Calmodulin deuteten bereits an, daß die Stimulierung von Histon Typ IIa nicht durch die spezifische Ca^{2+}-Bindungsfunktion des Calmodulins hervorgerufen wurde. Den Beweis, daß es sich nicht um eine klassische Ca^{2+}-Calmodulin-stimulierbare myosin light chain Kinase handelte, erbrachte der Bindungsversuch an Calmodulin-Sepharose 4B (siehe 4.3.6). Die Stimulierung der Phosphorylierung von Histon Typ IIa durch Calmodulin könnte in der Bildung eines Calmodulin-Histon Komplexes liegen, der ein besseres Substrat für die cAMP-unabhängige Proteinkinase darstellt oder basische Arginingruppen könnten durch Calmodulin blockiert werden und dadurch eine Inaktivierung des Enzyms verhindert werden, wie dies für die cGMP-abhängige Proteinkinase beschrieben ist [79,80]. Für die letztere Hypothese spricht, daß mit dem lysinreichen Substrat Histon H1 keine Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit nach 10 min festgestellt werden konnte und die Reaktion bis 30 min linear verlief (Ergebnis nicht gezeigt). Daß die Phosphorylierung von Histon Typ IIa und myosin light chains durch das gleiche Enzym katalysiert wird, konnte durch die Chromatographien an DE-52 und Histon-Sepharose 4B (siehe 4.3.7) nachgewiesen werden.

Katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase

Die Reinigung der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase erfolgte in zwei Schritten: (i) Bindung des Enzyms an Phosphocellulose P-11 (eine Modifizierung der Methode von Beavo et al. [61], und (ii) Affinitätschromatographie an STI-Sepharose 4B, die schon vorher für eine effektive Reinigung der katalytischen Untereinheit aus Skelettmuskel verwendet wurde [49]. Das Molekulargewicht von 39 000 D, das durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt wurde, ist in Übereinstimmung mit den in der Literatur berichteten Werten für Skelettmuskel aus Kaninchen

[81], Rinderherz [82], Rinderleber [83], und der Nebennierenrinde des Rindes [84]. Die spezifische Aktivität der gereinigten katalytischen Untereinheit von 250 U/mg ist ähnlich der durch Finn und Steis [84] berichteten. Diese Autoren reinigten die katalytische Untereinheit aus der Nebennierenrinde vom Stier durch ein Verfahren mit 5 Reinigungsschritten, indem sie vom Isotyp II der cAMP-abhängigen Proteinkinase ausgingen. Im Vergleich zu dieser Methode ist das in dieser Arbeit beschriebene Reinigungsverfahren (siehe 4.4) effizienter, da es die Isolierung der katalytischen Untereinheit aus beiden Typen der cAMP-abhängigen Proteinkinase in einer viel kürzeren Zeit in nur zwei Schritten erlaubt.

cGMP-abhängige Proteinkinasen

Die Entwicklung einer Reinigung in einem Schritt für die cGMP-abhängige Proteinkinase aus 100 Ü durch Affinitätschromatographie an cAMP-Agarose in der Gegenwart von Proteaseinhibitoren war unbedingt notwendig, um das Enzym vor einer Proteolyse zu schützen (siehe 4.5.1). Im Falle des Einschritt-Verfahrens wurde kein proteolytisches Folgeprodukt der 76 000 D Bande beobachtet, die die Untereinheit der cGMP-abhängigen Proteinkinase ist. Wenn jedoch eine pH 5.5 Fällung nach Nakazawa und Sano [52] und DE-52 Chromatographie der Affinitätschromatographie an cAMP-Agarose vorausgingen, wurde eine zweite Proteinbande vom MG 68 000 D gefunden. Diese Proteinbande wurde als ein proteolytisches Produkt der 76 000 D Untereinheit beschrieben [62], welches durch eine limitierte Proteolyse z.B. durch Trypsin entsteht. Der 100 Ü der Nebennierenrinde des Rindes scheint mehr proteolytische Aktivitäten zu enthalten, die in der Lage sind, die 76 000 D Bande zu spalten, als Hummermuskel oder Rinderlunge. Dies kann der Grund dafür sein, daß in einigen Fällen nach der pH 5.5 Fällung eine durch cGMP nicht aktivierbare Enzym-

aktivität gefunden wurde, die die Möglichkeit der Bindung an cAMP-Agarose verloren hatte, und daß Sharma et al. [85] 50 mM Benzamidin für die Ammoniumsulfat-Fällung und die DE-52 Chromatographie der cGMP-abhängigen Proteinkinase aus der Nebennierenrinde des Rindes benutzten. Die Aktivität der gereinigten cGMP-abhängigen Proteinkinase variierte mit den getesteten Histonfraktionen, mit einer spezifischen Aktivität von 56 U/mg gemessen mit Histon H1, das sich als bestes Substrat erwies. Dies ist eine spezifische Aktivität, die um 10- und 3-fach niedriger liegt als die spezifischen Aktivitäten, die für die Enzyme aus Lunge [86] und aus Rinderherz [87] angegeben sind.

Die Effekte von Calmodulin, das in einem molaren Verhältnis von 1:1 zu den jeweiligen Histonsubstraten zugesetzt wurde, stimmen überein mit den Resultaten von Walton und Gill [79], die den Einfluß eines sogenannten "Modulatorproteins" auf die Histonphosphorylierung durch cGMP-abhängige Proteinkinase untersuchten. Sowohl Calmodulin als auch andere "Modulatorproteine" üben zwei Effekte durch die Interaktion mit basischen Argininggruppen der Histonmoleküle aus [80]. Erstens verhindern sie die Interaktion des Histonmoleküls mit der cGMP-abhängigen Proteinkinase, die in einer "Aktivierung" der Basalaktivität (ohne cGMP im Ansatz) besteht, und zweitens in einer besseren Phosphorylierung des Histon-Calmodulin Komplexes. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen und denen von Walton und Gill [79,80] behaupteten Sharma et al. [85], daß der Effekt von Calmodulin auf Histon Typ IIa nur in einer Stimulierung der Phosphorylierungsrate besteht, ohne irgendeinen Effekt auf die Basalaktivität der cGMP-Kinase.

Substratspezifität der drei Histonkinasen

Der Vergleich der Substratspezifitäten der drei in dieser Arbeit isolierten Histonkinasen mit den exogenen Proteinsubstraten Histon und Protamin ergab, daß Protamin nur von

der cAMP-unabhängigen Proteinkinase phosphoryliert wurde (siehe 4.6). Dieses Substrat könnte als Unterscheidungskriterium zu den anderen durch cyclische Nukleotide regulierten Histonkinasen herangezogen werden.

Mögliche Beteiligung der verschiedenen Proteinkinasen an der Aktivierung von CEH

Das Ergebnis der endogenen Phosphorylierung des P-11 Durchlaufs (siehe 3.4) war von besonderem Interesse, da eine 86 K-Bande phosphoryliert worden war, die durch ^{3}H-DFP-Markierung in diesem Labor als Untereinheit der Cholesterinester-Hydrolase (CEH) identifiziert wurde. Die Cholesterinester-Hydrolase war auch nach Abtrennung der Caseinkinasen an P-11 weiterhin insbesondere in Gegenwart von cAMP aktivierbar. Dies deutete darauf hin, daß die Klasse der Caseinkinasen nicht an der Phosphorylierung bzw. Aktivierung der CEH beteiligt sind. In der für die Phosphorylierung mit den drei Histonkinasen benutzten partiell gereinigten Fraktion der CEH (gereinigt: Dissertation Dipl.-Chem. G. Eiteljörge) war bereits eine endogene Phosphorylierung festzustellen, die auf eine Kontamination mit einer endogenen Proteinkinase schließen ließ. Nach den Befunden in diesem Labor könnte es sich dabei um die cAMP-unabhängige Proteinkinase handeln. Ein deutlich verstärkter Einbau von [^{32}P]-Phosphat in die 86 K-Bande (Untereinheit der Cholesterinester-Hydrolase) wurde nur durch die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase erreicht. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, daß in die 86 K-Bande Phosphat eingebaut wird, wie schon in der Literatur durch Sonnenborn et al. [88] für die CEH und von Belfrage et al. [89] für die hormonsensitive Lipase gezeigt werden konnte. Ein weiterer Hinweis auf die physiologische Funktion einer Phosphorylierung durch die katalytische Untereinheit ist die Tatsache, daß nach Abtren-

nung der katalytischen Untereinheit von der CEH keine in vitro Aktivierung der Cholesterinester-Hydrolase mehr möglich war (C. Balkow, unveröffentliche Ergebnisse). Dies schließt jedoch nicht aus, daß CEH auch durch die anderen Histonkinasen in einer Art "Multiple site phosphorylation", wie dies für die Glycogen-Synthetase bekannt ist [69], ebenfalls phosphoryliert werden kann. Eine endgültige Antwort auf die Frage nach der "physiologisch" wirksamen Proteinkinase kann erst durch eine Abtrennung der CEH von jeglicher Proteinkinase-Aktivität und der gleichzeitigen Messung des Einbaus von [^{32}P]-Phosphat in die 86 K-Bande und in vitro Aktivierung der CEH gegeben werden.

6. Zusammenfassung

1. 5 unterschiedliche Proteinkinasen aus der Nebennierenrinde des Rindes konnten mit den Modellsubstraten Histon und Casein identifiziert und voneinander getrennt werden.

2. Die Caseinkinase A konnte nach den Kriterien der SDS-Elektrophorese (Untereinheit: 57 000 D) bis zur apparenten Homogenität gereinigt werden. Die spezifische Aktivität betrug 36 U/mg. Es wurde demonstriert, daß das Enzym wahrscheinlich durch Proteolyse aus einem "Precursor" entsteht.

3. Die Caseinkinase G konnte partiell bis zu einer spezifischen Aktivität von 60 U/mg gereinigt werden. Der Einfluß von Polyaminen auf die Phosphorylierung von Casein sowie auf die endogene Phosphorylierung wurde untersucht. Sowohl die Casein-Phosphorylierung als auch der Einbau von [^{32}P]-Phosphat in endogene Proteinbanden wurde durch Polyamine stimuliert.

4. Die partiell gereinigte cAMP-unabhängige Proteinkinase wurde hinsichtlich ihres nativen Molekulargewichtes (250 000 D) und des isoelektrischen Punktes (pI ~ 5.5) näher charakterisiert. Das Enzym phosphoryliert sowohl Histon Typ IIa als auch myosin light chains und Protamin.

5. Die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase wurde in 2 Schritten bis zur Homogenität gereinigt. Die spezifische Aktivität betrug 250 U/mg (Substrat Histon Typ IIa) und die SDS-Elektrophorese ergab eine Bande vom MG 39 000 D.

6. Die cGMP-abhängige Proteinkinase konnte in einem Schritt durch Affinitätschromatographie an cAMP-Agarose bis zur Homogenität gereinigt werden (Untereinheit:76 000 D). Sowohl die Basalaktivität (ohne cGMP) als auch die durch cGMP stimulierte Aktivität wurde durch Calmodulin beeinflußt.

7. Die Phosphorylierung einer partiell gereinigten CEH-Fraktion mit den drei Histonkinasen zeigte, daß Phosphat in die 86 K-Untereinheit der CEH insbesondere von der katalytischen Untereinheit eingebaut wird.

7. Literaturverzeichnis

[1] Deane, H.W.
The anatomy, chemistry and physiology of adrenocortical tissue. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie (1962) Vol. 14, Teil 1, 1-185. Springer Verlag, Berlin, Göttingen und Heidelberg

[2] Hayano, M., Saba, N., Dorfmann, R.I. und Hechter, O. (1956) Recent Prog. Horm. Res. 12, 79-123

[3] Ulick, S., Nicolis, G.N. und Vetter, K.K. (1964)
In: Aldosteron (Herausgeber: Baulieu, E.E. und Robel, P.), 3-17, Blackwell Oxford

[4] Schulster,D., Burstein, S. und Cooke, B.A. (1976)
Molecular Endocrinology of the Steroid Hormones. John Wiley, London

[5] London, E.J., Greenberg, D.M. (1954)
J. Biol. Chem. 209, 493-498

[6] Moore, J.H., Noble, R.C., O'Donoghue, P.N. (1967)
Can. J. Biochem. 45, 1335-1339

[7] Makin, H.L.J. (1975)
Biochemistry of the Steroid Hormone, Blackwell, London

[8] Finkelstein, M. und Shaefer, J.M. (1979)
Physiol. Rev. 59, 353-406

[9] McKerns, K.W. (1968)
Functions of the adrenal cortex, Vol. 1 and 2, Appleton-Century-Crofts, New York

[10] Schulster, D. (1974)
Adv. Steroid. Biochem. Pharmacol., 4, 233-295

[11] Halkerston, J.D.K. (1975)
Adv. Cyclic Nukleotide Res. 6, 99-136

[12] Saffran, M., Grad, B. und Bayliss, M.J. (1952)
Endocrinology 50, 639-643

[13] Haynes, R.C. und Berthet, L. (1975)
J. Biol. Chem. 225, 115-124

[14] Garren, L., Ney, R.L. und Davis, W.W. (1965)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 1443-1450

[15] Grahame-Smith, D.G., Butcher, R.W., Ney, R.J. und Sutherland, E.W. (1967)
J. Biol. Chem. 242, 5535-5541

[16] Schulster, D., Tait, S.A.S., Tait, J.F. und Mortek, J. (1970)
Endocrinology 86, 487-502

[17] Seeling, S. und Sayers, G. (1973)
Arch. Biochem. Biophys. 154, 230-239

[18] Civen, M. und Brown, C.B. (1974)
Pestic. Biochem. Physiol. 4, 254-259

[19] Sharma, R.K., Ahmed, N.K. und Shanker, G. (1976)
Eur. J. Biochem. 70, 427-433

[20] Rubin, R.P., Laychock, S.G. und End, D.W. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 496, 329-338

[21] Laychock, S.G. und Hardman, J.G. (1978)
J. Cyclic Nucleotide Res. 5, 335-344

[22] Li, C.H. (1962)
Rec. Progr. Horm. Res. 18, 1-32

[23] Schwyzer, R. (1977)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 297, 3-26

[24] Schwyzer, R., Schiller, P., Seelig, S. und Sayers, G. (1971) FEBS-Lett.19, 229-231

[25] Seelig, S., Kumar, S. und Sayers, G. (1972)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 1217-1219

[26] Richardson, M.C. und Schulster, D. (1972)
J. Endocrinol. 55, 140-148

[27] Schimmer, B.P., Ueda, K. und Sato, G.H. (1968)
Biochem.Biophys. Res. Commun. 32, 806-810

[28] Lefkowitz, R.J., Roth, J., Priar, W. und Pastan, I. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65, 745-752

[29] Slinger, R.C.L. und Civen, M. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 993-999

[30] Golder, M.P. und Boyns, A.R. (1972) Biochem. J. 129, 7-13

[31] Rubin, R.P. und Laychock, S.G. (1978) Ann. N.Y. Acad. Sc . 307, 377-390

[32] Mahaffee, D.D. und Ontjes, D.A. (1977) J. Cycl. Nucl. Res. 3, 325-334

[33] Beall, R.J. und Sayers, G. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 148, 70-76

[34] Perchellet, J.P., Shanker, G. und Sharma, R.K. (1978) Science 199, 311-312

[35] Perchellet, J.P. und Sharma, R.K. (1979) Endocrinology 105, 879-883

[36] Harrington, C.A., Fenimore, D.C. und Farmer, R.W. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 55-61

[37] Earp, H.S. und Steiner, A.L. (1978) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 18, 431-459

[38] Schimmer, B.P., Tsao, J. und Knapp, M. (1977) Mol. Cell. Endocrinol. 8, 135-145

[39] Masui, H., Reid, L.M. und Glaus, C. (1978) Exp. Cell Res. 117, 219-230

[40] Sayers, G., Beall, R.J. und Seelig, S. (1972) Science 175, 1131-1133

[41] Kowluru, R.A., George, R. und Jefcoate, C.R. (1983) J. Biol. Chem. 258, 8053-8059

[42] Farese, R.V., Sabir, M.A. und Larson, R.E. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7232-7237

[43] Krebs, E.G., Graves, D.J. und Fischer, E.H. (1959) J. Biol. Chem. 234, 2867-2870

[44] Friedman, D.L. und Larner, J. (1963)
Biochemistry 2, 669-675

[45] Walsh, D.A., Perkins, J.P. und Krebs, E.G. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 3763-3765

[46] Gill, G.N. und Garren, L.D. (1970)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 335-343

[47] Cochet, C., Job, D. und Chambaz, E.M. (1977)
FEBS-Lett. 83, 53-58

[48] Job, D., Cochet, C., Pirollet, F. und Chambaz, E.M. (1979) FEBS-Lett. 98, 303-308

[49] Alhatany, E., Bashan, N., Moses, S. und Shaltiel, S. (1979) Eur. J. Biochem. 101, 283-290

[50] Glynn, J.M. und Chapell, J.B. (1964)
Biochem. J. 90, 147-149

[51] Ashby, C.D. und Walsh, D.A. (1974)
in: Methods of Enzymology, Vol. XXXVIII(Hardman, J.G. und O'Malley, B.W., eds.) part C, 351, Academic Press, New York

[52] Nakazawa, K. und Sano, M. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 7415-7419

[53] Cross, R.L. und Nalin, C.M. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 2874-2881

[54] Lowry, O.H., Rosebrough, N.I., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275

[55] Bradford, M.M. (1976) Analyt. Biochem. 72, 248-254

[56] Mans, R.J. und Novelli, G.D. (1961)
Arch. Biochem. Biophys. 94, 48-53

[57] Walter, U. und Greengard, P. (1983)
Methods in Enzymology (Hormone Action), im Druck

[58] Laemmli, U.K. und Favre, M. (1973)
J. Mol. Biol. 80, 575-599

[59] Davis, B.J. (1964)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-424

[60] Gagelmann, M., Pyerin, W., Kübler, D. und Kinzel, V. (1978) Analyt. Biochem. 93, 52-59

[61] Beavo, J.A., Bechtel, P.J. und Krebs, E.G. (1974) in: Methods in Enzymology, Vol. XXXVIII (Hardman, J.G. und O'Malley, B.W., eds.) part C, 299-308, Academic Press, New York

[62] Gill, G.N., Monken, C.E. und Walton, G.M. (1981) in: Protein phosphorylation, Vol. 8 (Rosen, O.M. und Krebs, E.G., eds.) book A, pp. 251-265 Cold Spring Harbor Laboratory, USA

[63] Issinger, O.G. (1977) Biochem. J. 165, 511-516

[64] Meggio, F., Donella-Deana, A. und Pinna, L.A. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 8-13

[65] Hathaway, G.M. und Traugh, J.A. (1979) J. Biol. Chem. 254, 762-767

[66] Cochet, C., Job, D., Pirollet, F. und Chambaz, E.M. (1980) Endocrinology 106, 750-757

[67] Maragoudakis, M.E. und Hankin, H. (1977) Biochim. Biophys. Acta 480, 123-127

[68] Dahmus, M.E. und Natzle, J. (1977) Biochemistry 16, 1901-1906

[69] Cohen, P., Yellowlees, D., Aitken, A., Donella-Deana, A., Hemmings, B.A. und Parker, P.J. (1982) Eur. J. Biochem. 124, 21-35

[70] Mäenpää, P.H. (1977) Biochim. Biophys. Acta 498, 294-298

[71] Feige, J.J., Pirollet, F. und Chambaz, E.M. (1980) FEBS-Lett. 121, 139-142

[72] Job, D., Cochet, C., Pirollet, F. und Chambaz, E.M. (1979) FEBS-Lett. 98, 303-308

[73] Thornburg, W. und Lindell, T.J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 6660-6664

[74] Cochet, C. und Chambaz, E.M. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 1403-1406

[75] Rose, K.M., Stetler, D.A. und Jakob, S.T. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2833-2837

[76] Traugh, J.A., Ashby, C.D. und Walsh, D.A. (1974)
in: Methods in Enzymology, Vol. XXXVIII (Hardman, J.G. und O'Malley, B.W., eds.) part C, pp. 290-299, Academic Press, New York

[77] Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. und Nishizuka, Y. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7603-7616

[78] Katch, N., Wrenn, R.W., Wise, B.C., Shoji, M. und Kuo, J.F. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4813-4817

[79] Walton, G.M. und Gill, G.N. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 1603-1609

[80] Walton, G.M. und Gill, G.N. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 1681-1688

[81] Bechtel, P.J., Beavo, J.A. und Krebs, E.G. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 2691-2697

[82] Peters, K.A., Demaille, J.G. und Fischer, E.H. (1977)
Biochemistry 16, 5691-5697

[83] Sugden, P.H., Holladay, L.A., Reimann, E.M. und Corbin, J.D. (1976) Biochem. J. 159, 409-422

[84] Steiss, R.G. und Finn, F.M. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 1245-1252

[85] Ahrens, H., Aranjaniyil, K.P., Kuroda, J. und Sharma, R.K. (1982)
Arch. Biochem. Biophys. 215, 597-609

[86] Gill, G.N., Holdy, K.E., Walton, G.M. und Kanstein, C. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 3918-3922

[87] Flockerzi, V., Speichermann, N. und Hofmann, F. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3395-3399

[88] Sonnenborn, U., Eiteljörge, G., Trzeciak, W.H. und Kunau, W.-H. (1982) FEBS-Lett. 145, 271-276

[89] Fredrikson, G., Strålfors, P., Nilsson, N.Ö. und Belfrage, P. (1981) J. Biol. Chem. 256, 6311-6320

LEBENSLAUF	Manfred Hiep
24.06.1953	geboren als Sohn der Eheleute Theo und Marianne Hiep, geb. Peters in Goch Eheschließung am 25.09.1981 mit Kornelia Franken
1959 - 1964	Besuch der katholischen Volksschule Liebfrauen in Goch
1964 - 1972	Besuch des neusprachlichen Städt. Gymnasiums in Goch
Mai 1972	Abitur
1972 - 1973	Studium der Chemie an der Universität Bonn
1973	Aufnahme des Chemie-Studiums an der Ruhr-Universität Bochum
März 1976	Diplomvorexamen
Oktober 1979	Diplomhauptexamen
Januar 1979 - Januar 1980	Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie der Ruhr-Universität Bochum mit dem Titel: "Isolierung und Charakterisierung der Xanthin-Dehydrogenase aus Drosophila melanogaster".
Februar 1980 - Oktober 1983	Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I, Arbeitsgruppe für Bioorganische Chemie, der Ruhr-Universität Bochum